



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – IQB



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA – PPGQB

LABORATÓRIO DE ELETROQUÍMICA

**“ESTUDO BIOELETROQUÍMICO DE COMPOSTOS
ELETROBIOATIVOS. RELAÇÃO ESTRUTURA-
ELETROATIVIDADE E UTILIZAÇÃO DE BIOSSENSOR DE
DNA NO ESTUDO DE AGENTES INTERCALANTES E
ALQUILANTES DE DNA”**

Francine Santos de Paula

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília Oliveira Fonseca Goulart

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino

*Maceió – Alagoas
Agosto de 2006*



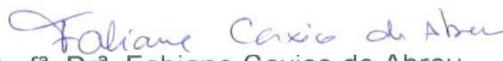
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de **Francine Santos de Paula**, intitulada: **“ESTUDO BIOELETRQUÍMICO DE COMPOSTOS ELETROBIOATIVOS. RELAÇÃO ESTRUTURA – ELETROATIVIDADE EM AZOXIAROMÁTICOS E UTILIZAÇÃO DE BIOSSENSOR DE DNA NO ESTUDO DE AGENTES INTERCALANTES E ALQUILANTES DE DNA”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 25 de agosto de 2006, às 08:30 horas no auditório do Núcleo de Pesquisa Multidisciplinar (Severinão).

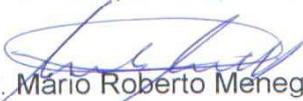
COMISSÃO JULGADORA

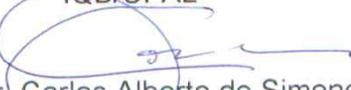

Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Orientadora - IQB/UFAL


Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico de Abreu
IQB/UFAL
Co-orientadora - IQB/UFAL

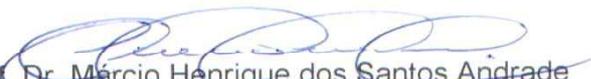

Prof. Dr. Lauro Tatsu Kubota
IQ/UNICAMP


Prof^a. Dr^a. Adriana Santos Ribeiro
UFAL- Campus Arapiraca


Prof. Dr. Mário Roberto Meneghetti
IQB/UFAL


Prof. Dr. Carlos Alberto de Simone
IQB/UFAL


Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Escola de Farmácia e Enfermagem /UFAL


Prof. Dr. Márcio Henrique dos Santos Andrade
TRIKEM/ Maceió- AL

*Dedico esse trabalho ao meu
filho **Robinho**, minha maior fonte
de amor e alegria.*

Agradeço especialmente a

minha mãe Sônia e ao meu pai Zito pela oportunidade e sacrifícios, com muito amor e carinho.

toda minha família, Esposo, Mãe, Pai, Irmã, Sogra, Sogro e meu sobrinho Léo, que sempre estiveram presentes nos momentos que mais precisei, cuidando do meu filho, dando todo o amor e carinho de que ele precisou nas horas em que eu estive ausente.

Profa. Marília pela amizade, compreensão, dedicação, ensinamentos e incentivo em todos os momentos;

Prof. Nivaldo Soares e a Profa. Fabiane Caxico pela grande amizade cultivada ao longo desse tempo.

Agradeço ainda,

a todo o pessoal do Laboratório de Eletroquímica do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL, especialmente aos amigos que me ajudaram ao longo da confecção desse trabalho;

ao Écio Sales que me ajudou muito participando ativamente dos experimentos de correlação do Efeito do Substituente;

a todos os grandes amigos que estiveram sempre ao meu lado, amigos realmente especiais que sei que contarei sempre com eles, em especial, Laurinha (Laura Souza) e Alinete (Aline Fidelis);

à Profa. Marília Goulart e a Profa. Fabiane Caxico pela orientação e valiosas discussões em todos os momentos;

ao Prof. Josealdo Tonholo pelos ensinamentos essenciais em Eletroquímica;

à Profa. Carmem Zanta pela amizade e força durante esse tempo;

à Profa. Roberta Fruttero e ao Prof. Alberto Gasco, pela concessão das amostras analisadas nesse trabalho;

ao Aldy pela arte em hialotecnia e pelas cópias e encadernação de todo o material;

a todos os professores e funcionários do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL que contribuíram para a minha formação;

a CAPES, pela bolsa de estudos concedida;

a FAPEAL, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro ao grupo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – ELETROQUÍMICA: ALGUNS ASPECTOS E CONCEITOS.....	1
1.2 – ELETROQUÍMICA EM QUÍMICA MEDICINAL.....	4
1.3 – DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE FÁRMACOS	21
1.4 – BIOCENSO DE DNA.....	22
1.5 – CLASSES DE SUBSTÂNCIAS ELETROBIOATIVAS ESCOLHIDAS	28
1.5.1 – <i>N-ÓXIDOS</i>	28
1.5.2 – <i>ÁCIDO CALVÁTICO E ANÁLOGOS</i>	31
1.5.3 – <i>TRIAZENOS</i>	33
1.5.4 – <i>BERENIL (10)</i>	34
1.5.5 – <i>MOSTARDAS</i>	35
1.5.6 – <i>MECLORETAMINA</i>	37
2. OBJETIVOS	40
2.1. OBJETIVOS GERAIS	40
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3. METODOLOGIA	42
3.1 – TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS.....	42
3.1.1 – <i>VOLTAMETRIA CÍCLICA</i>	43
3.1.2 – <i>VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (VPD)</i>	44
3.1.3 – <i>VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA (VOQ)</i>	46
3.1.4 – <i>ELETRÓLISE E COULOMETRIA</i>	48
4. EXPERIMENTAL	50
4.1 – REAGENTES E SOLVENTES.....	50
4.2 – ESTUDOS ELETROQUÍMICOS	50

4.2.1 – VOLTAMETRIA CÍCLICA, VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL e VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA.....	50
4.2.2 – COULOMETRIA.....	53
4.3 – ESTUDO ELETROQUÍMICO EM BIOSENSOR DE dsDNA.....	54
4.3.1. ESPECIFICAÇÕES DO dsDNA.....	55
4.3.2. PREPARAÇÃO DO GEL DE DNA.....	55
4.3.3. PREPARAÇÃO DO BIOSENSOR DE dsDNA.....	55
4.3.4. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ssDNA.....	56
4.3.5. ÁCIDO CALVÁTICO.....	57
4.3.6. BERENIL.....	57
4.3.7. MECLORETAMINA EM SOLUÇÃO.....	58
4.3.8. MECLORETAMINA E TRIETILAMINA INCORPORADAS NO GEL DE DNA.....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1 – ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DO ÁCIDO CALVÁTICO E ANÁLOGOS EM MEIO APRÓTICO E EM MEIO PRÓTICO. EFEITO DOS SUBSTITUINTES.....	59
5.1.1 – REDUÇÃO ELETROQUÍMICA E EFEITO DOS SUBSTITUINTES EM MEIO APRÓTICO.....	59
5.1.2 – REDUÇÃO DO ÁCIDO CALVÁTICO E DE ANÁLOGOS EM MEIO PRÓTICO E O EFEITO DOS SUBSTITUINTES.....	74
5.1.3 – TENTATIVA DE CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	86
5.2 – ESTUDO DA VARIAÇÃO DO POTENCIAL DE REDUÇÃO COM O pH E CURVAS ELETROANALÍTICAS DO ÁCIDO CALVÁTICO (1) E SEU ANÁLOGO (2).....	89
5.3 – COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DETALHADO DA REDUÇÃO DO ÁCIDO CALVÁTICO EM MEIO PRÓTICO.....	97
5.4 – ESTUDO ELETROQUÍMICO DO ÁCIDO CALVÁTICO (1) E DE 2 EM BIOSENSOR DE dsDNA.....	103
5.5 – ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO BERENIL FRENTE AO BIOSENSOR DE dsDNA.....	114
5.6 – ESTUDO DO COMPORTAMENTO DA MECLORETAMINA FRENTE AO BIOSENSOR DE dsDNA.....	119
6. CONCLUSÕES.....	125
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de transferência eletrônica. (a): Metais (eletrodos) com diferentes níveis energéticos de Fermi. (b): Processo de redução desfavorável. (c): Processo de redução favorável ²	2
Figura 2. Algumas substâncias bioeletroativas.....	7
Figura 3. Atuação de quinonas na geração de espécies oxigenadas reativas (EOR) e destoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (SOD). Várias outras moléculas podem exercer papel semelhante, como nitroaromáticos, sais de imínio e compostos quinonóides.	8
Figura 4. Representação de mecanismos pelos quais pró-fármacos ativados por biorredução exercem suas atividades farmacológicas. A: Ativação seletiva em hipóxia; B: Ativação em condições normais, geração do Estresse Oxidativo. Adaptado da referência ¹¹	10
Figura 5. Mecanismo redutivo de formação de ligações intra-fitas no DNA, a partir de diaziridinilquinonas (XVI). Adaptado da referência ⁸	11
Figura 6. Principais passos redox para a transformação metabólica do etoposídeo (VII) mediada por mono-oxigenase/peroxidase P450. Essas transformações alteram o grupo dimetoxifenol ¹⁴	12
Figura 7. Proposta mecanística para a transformação do ferrocifeno XV em quinonametídeo XVIII, provável espécie reativa. O ataque nucleofílico pode ser realizados em regiões distintas ¹⁵	13
Figura 8. Secção transversal de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância capilar (adaptado da referência).....	14
Figura 9. Diferença de mecanismo de ação biológica em função do conteúdo de oxigênio celular.	15
Figura 10. Potenciais redox (pH 7,0) da redutase NADPH-citocromo P-450 (FAD-FMN, $E_{m,7}$) e potenciais de redução monoelétrônicos de xenobióticos (E^1_{7}). Os valores para as enzimas foram determinados por Iyanagi e colaboradores e os dos produtos químicos são valores da literatura. Adaptado da referência ²⁰	16
Figura 11. Estruturas dos cofatores mononucleotídeos da flavina.....	17
Figura 12. Ligações de hidrogênio entre as nucleobases do DNA em fita dupla.	23
Figura 13. Representação do DNA, em fita dupla e em fita simples, evidenciando suas bases constituintes, guanina (G), adenina (A), citosina (C) e timina (T). ...	24

Figura 14. Representação do modo de operação do biossensor de DNA. O analito entra entre as fitas do DNA, modifica sua conformação, o que leva à exposição de suas bases, passíveis de oxidação anódica.....	25
Figura 15. Voltamogramas de pulso diferencial (carbono vítreo) para a mistura das bases guanina, adenina ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), timina e citosina ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Tampão fosfato pH 7,4. $v = 5 \text{ mVs}^{-1}$, amplitude 50 mV. Adaptado da referência ³⁰	26
Figura 16. Estrutura química da β -lapachona (XXI) e α -lapachona (XXII).....	27
Figura 17. Voltametria de pulso diferencial do biossensor de dsDNA com β -lapachona, $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de (....dsDNA) e (___ após 24, 30 e 48 h.). Tampão acetato, pH 4,5, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. ⁴¹	28
Figura 18. Metabolismo redutivo da tirapazamina (VIII), mediado por redutases. ⁴⁷ ..	30
Figura 19. Esquema proposto para a reação do ácido calvático (1) com GST P1-1 e L-cisteína ($R = p\text{-HOOC}_6\text{H}_4$) ⁵⁷	32
Figura 20. Triazenos biologicamente ativos	34
Figura 21. Interação do berenil com as nucleobases. ⁶⁸	35
Figura 22. Formação de ligações cruzada DNA-DNA.....	37
Figura 23. Mecanismo de ação dos compostos alquilantes ⁶³	39
Figura 24. Estruturas químicas dos compostos estudados.....	41
Figura 25. Célula polarográfica/voltamétrica de três eletrodos.....	43
Figura 26. Técnica da VC. Perturbação aplicada e resposta obtida.....	43
Figura 27. Voltametria de Pulso Diferencial. (A) Esquema de aplicação de potenciais (algumas vezes sobrepostos numa rampa, em vez de numa escada); (B) Perfil corrente-potencial esquemático ¹	45
Figura 28. A: Seqüência potencial vs. tempo (E vs. t) usada em voltametria de onda quadrada. B: Parâmetros tempo e potencial aplicado em voltametria de onda quadrada, onde: τ = tempo de um ciclo de onda quadrada; $1/\tau$ = freqüência da onda quadrada em Hz; E_{sw} = amplitude de pulso da onda quadrada em mV; E_{etapa} = potencial em mV da etapa de rampa de potencial em degraus e $2E_{sw}$ é a amplitude de pico a pico da onda quadrada em mV.....	47
Figura 29. Voltametria de Onda Quadrada (VOQ), perfil corrente-potencial esquemático. (A) Sistema reversível. (B) Sistema irreversível.....	48

Figura 30. Representação da cela eletroquímica utilizada em biossensor de DNA...	56
Figura 31. Voltametria cíclica de 1 (0,002 mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$	60
Figura 32. Voltametria cíclica de 2 (0,002 mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varreduras sucessivas a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs v ; D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic. F: E_{pc2} vs $\log v$, onda IIc.	61
Figura 33. Voltametria cíclica de 5 (0,002 mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varreduras sucessivas a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs v . D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic. F: E_{pc2} vs $\log v$, onda IIc.....	62
Figura 34. Voltametria cíclica de 6 (0,002 mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varreduras sucessivas a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs v . D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic. F: E_{pc2} vs $\log v$, onda IIc.	63
Figura 35. Voltametria cíclica de 7 (0,002 mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varredura sucessiva a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs v . D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic. F: E_{pc2} vs $\log v$, onda IIc.	64
Figura 36. Voltametria cíclica de 8 (0,002 mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varredura sucessiva a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs v . D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic. F: E_{pc2} vs $\log v$, onda IIc.	65
Figura 37. Voltametria cíclica de 3 (0,002 mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varreduras sucessivas a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs v . D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic. F: E_{pc2} vs $\log v$, onda IIc.....	66
Figura 38. Mecanismo simplificado de redução de compostos nitroaromáticos e arilazoxicianetos em meio aprótico.....	67
Figura 39. Voltametria cíclica de 4 (0,002 mol L ⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L ⁻¹ , carbono vítreo. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varredura sucessiva a	

$v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs v . D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic. F: E_{pc3} vs $\log v$, onda IIIc.....	68
Figura 40. Provável mecanismo para a redução de azoxi- e azocianetos em meio aprótico.....	70
Figura 41. Gráficos de correlação E_{pc1} dos compostos 2-8 vs. constantes de substituintes de Hammett.....	72
Figura 42. Voltametria cíclica de 2 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,9, carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: Varredura sucessiva a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: I_{pc1} vs v . F: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic..	75
Figura 43. Voltametria cíclica de 3 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico tamponado (tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), pH = 6,9, carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: Varreduras sucessivas a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: I_{pc1} vs v . F: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic.....	76
Figura 44. Voltametria cíclica de 5 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,9, carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: Varredura sucessiva em $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: I_{pc1} vs v . F: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic.....	77
Figura 45. Voltametria cíclica de 6 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,9, carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: Varredura sucessiva em $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: I_{pc1} vs v . F: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic.....	78
Figura 46. Voltametria cíclica de 7 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,9, carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: Varredura sucessiva a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: I_{pc1} vs v . F: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic.....	79
Figura 47. Voltametria cíclica de 8 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,9, carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: Varredura sucessiva a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: I_{pc1} vs v . F: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic.....	80
Figura 48. Voltametria cíclica de 4 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,9, carbono vítreo, varreduras sucessivas. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$	81

Figura 49. Voltametria cíclica de 4 (0,001 mol L ⁻¹) em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH = 6,9, carbono vítreo. A: $\nu = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs $\nu^{1/2}$. D: I_{pc1} vs ν . E: E_{pc1} vs $\log \nu$, onda Ic. F: E_{pc2} vs $\log \nu$, onda IIc.	82
Figura 50. A: Eletrólise do composto 4 em $E_{ap} = -0,400 \text{ V}$. B: Voltametria cíclica, antes e após a eletrólise.	83
Figura 51. Provável mecanismo para a redução de azoxi- e azocianetos em meio prótico ⁷⁵	84
Figura 52. Gráficos de correlação E_{pc1} dos compostos 2-8 vs. constantes de substituinte de Hammett. A: E_{plc} vs. σ_p . B: E_{plc} vs. $\sigma_p(\sigma^-)$	85
Figura 53. Gráfico de I_p vs. E_p vs. pH obtido pela técnica de Voltametria de Pulso Diferencial para o Ácido Calvático (0,001 mol L ⁻¹); meio aquoso tamponado com 20% de etanol, amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$	90
Figura 54. A: Gráfico de I_p vs. pH. B: Gráficos de E_p vs. pH para os picos da VPD correspondentes à redução de 1. Obtenção dos pK_{a1} e pK_{a2} para 1. Amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$	91
Figura 55. Gráfico de I_p vs. E_p vs. pH obtido pela técnica de Voltametria de Pulso Diferencial para o composto 2 (0,001 mol L ⁻¹); meio aquoso tamponado com 20% de etanol, amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$	92
Figura 56. Gráfico de E_p vs. pH para os picos da VPD correspondentes à redução de 2.	93
Figura 57. A: Mecanismo provável de redução do Ácido Calvático em meio ácido – pH baixo. B: Exemplo de hidrólise básica que pode ocorrer com 1 em meio alcalino. C: Representação da dissociação do Ácido Calvático (1).	94
Figura 58. Representação da dissociação do composto 2, $pK_{a1} = 6,2$	95
Figura 59. A: VPD de 1 para várias concentrações, 0,1 mol L ⁻¹ , tampão fosfato, pH 6,9. Amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$. B: Análise da corrente de E_{plc} versus concentração de 1.	95
Figura 60. A: VPD de 2 para várias concentrações (mol L ⁻¹), tampão fosfato, pH 6,9. Amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$. B: Análise da corrente de E_{plc} versus concentração de 2.	96

Figura 61. Ácido Calvático (0,001 mol L ⁻¹) em meio prótico tamponado, eletrodo de carbono vítreo. A: VC em pH = 1,2, $v = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$; B: VOQ em pH = 1,2, $f = 10 \text{ Hz}$; C: VPD em pH = 1,2, $v = 0,005 \text{ Vs}^{-1}$; D: VC em pH = 4,5, $v = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$; E: VOQ em pH = 4,5, $f = 10 \text{ Hz}$; F: VPD em pH = 4,5, $v = 0,005 \text{ Vs}^{-1}$	97
Figura 62. Mecanismo provável de redução do Ácido Calvático em meio ácido.....	98
Figura 63. Ácido Calvático (0,001 mol L ⁻¹) em meio prótico tamponado, pH = 1,2 e 4,5, eletrodo de carbono vítreo. A: VC em $v = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$; B: VOQ em $f = 100 \text{ Hz}$	98
Figura 64. Ácido Calvático (0,001 mol L ⁻¹) em meio prótico tamponado (tampão fosfato), pH = 5,6, eletrodo de carbono vítreo. A: VC em $v = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$; B: VOQ em $f = 100 \text{ Hz}$. C: Gráfico de E_{pc1} vs. v . D: VPD em $v = 0,005 \text{ Vs}^{-1}$	99
Figura 65. Ácido Calvático (0,001 mol L ⁻¹) em meio prótico tamponado (tampão fosfato), pH = 6,9, eletrodo de carbono vítreo. A: VC em $v = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$; B: VOQ em $f = 10 \text{ Hz}$. C: Gráfico de E_{pc1} vs. v . D: VPD em $v = 0,005 \text{ Vs}^{-1}$	101
Figura 66. VPD do Ácido Calvático (0,001 mol L ⁻¹) em meio aquoso-etanólico (8:2) tamponado (tampão acetato), pH = 4,5, eletrodo de carbono vítreo, $v = 0,005 \text{ Vs}^{-1}$. A: Varreduras sucessivas de +0,600 V a -0,600 V. B: Varredura na faixa positiva de 0 a +1,400 V. C: Varredura na direção positiva de -0,600 V a +0,600 V. D: Varredura na direção positiva de -0,400 V a +0,400 V.	102
Figura 67. Voltametria de pulso diferencial em biossensor de dsDNA. (1) Biossensor de dsDNA imerso na solução tampão acetato (pH=4,5); (2) Biossensor de dsDNA imerso na solução ssDNA, originando a hélice tripla.....	104
Figura 68. Esquema para a oxidação das bases púricas ²⁶	105
Figura 69. Voltametria de pulso diferencial de uma solução de ácido calvático (0,002 mol L ⁻¹) em biossensor de dsDNA. (A e B) VPD sentido anódico. (C) VPD sentido catódico.	107
Figura 70. Ácido calvático (50 μL , 0,002 mol L ⁻¹) após 24 horas de contato com o biossensor de dsDNA. (A) Primeira varredura de VPD após a imersão do Biossensor na solução tampão acetato (pH=4,5); (B e C) VPD sentido anódico. (D) VPD sentido catódico. (E) VOQ sentido catódico. (F) VOQ sentido anódico.	108
Figura 71. Ácido calvático (50 μL , 0,002 mol L ⁻¹) após 24 horas de contato com o biossensor de dsDNA. (A) Primeira varredura de VPD após a imersão do	

Biossensor na solução tampão acetato (pH=5,6); (B) VPD sentido anódico. (C) VPD sentido catódico. (D) VPD sentido catódico, comparação entre os pH's 4,5 e 5,6.	110
Figura 72. Composto 2 (solução a 0,002 mol L ⁻¹) em (A) carbono vítreo e em (B) biossensor de dsDNA. (C) e (D) Composto 2 (50 μL, 0,002 mol L ⁻¹) após 24 horas de contato com o biossensor de dsDNA. (C) VPD após a imersão do Biossensor na solução tampão acetato (pH=4,5), faixa de 0 a +1,400 V; (D) VPD sentido catódico, de +0,600 V a -0,600 V.	112
Figura 73. Comparação entre os voltamogramas (em VPD) do Ácido calvático (1) e do composto 2 (C ₁ e C ₂ = 0,002 mol L ⁻¹ , quantidade adicionada ao biossensor = 50 μL.), obtidos após 24 horas de contato com o biossensor de dsDNA.	113
Figura 74. Berenil (0,001 mol L ⁻¹), em eletrodo de carbono vítreo, tampão acetato (pH=4,5). (A) Voltametria Cíclica, a 0,100 V s ⁻¹ . (B) Voltametria de pulso diferencial.	114
Figura 75. Provável mecanismo de redução do berenil.	115
Figura 76. Berenil (0,001 mol L ⁻¹), em eletrodo de carbono vítreo, tampão acetato (pH=4,5), Voltametria Cíclica. (A) velocidades diferentes. (B) a 0,100 V s ⁻¹ antes e após a eletrólise.	115
Figura 77. Voltametria de pulso diferencial de soluções de concentrações diferentes de Berenil, em tampão acetato, biossensor de dsDNA. (A) após 5 h de contato, (B) após 24 h de contato.	116
Figura 78. Voltametria de pulso diferencial do berenil (50 μL adicionados ao biossensor), em tampão acetato, biossensor de dsDNA, após 24 horas de contato. (A) Berenil, c = 2 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ . (B) Berenil, c = 1 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ e c = 1 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	117
Figura 79. VPD de uma solução de ssDNA na ausência e presença do berenil.	118
Figura 80. Mecloretamina (0,004 mol L ⁻¹), em eletrodo de carbono vítreo, tampão acetato (pH=4,5). A: Voltametria Cíclica, a 0,100 V s ⁻¹ . B: Voltametria de pulso diferencial, a 0,005 V s ⁻¹ . C: Gráfico de <i>I</i> _{pa} vs. v ^{1/2} . D: Gráfico de <i>E</i> _{pa} vs. log v.	120
Figura 81. Voltametria de pulso diferencial da Mecloretamina (4 mmol L ⁻¹), em tampão acetato, pH = 4,5. A: Em biossensor de dsDNA, varreduras sucessivas, a seta indica o aumento da corrente com o número de varreduras. B:	

(a) Mecloretamina em eletrodo carbono vítreo. (b) Branco (Biossensor de <i>dsDNA</i> em ausência de mecloretamina). (c) Mecloretamina em biossensor de <i>dsDNA</i> (20 μL da solução 4 mmol L^{-1} aplicada ao gel de <i>dsDNA</i> e deixada em contato por 24 horas), 1ª varredura após 24 horas.....	121
Figura 82. Efeito do tempo de exposição da mecloretamina em tampão acetato, pH = 4,5, no biossensor de <i>dsDNA</i> . A, B, C: $c = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A: Tempo de exposição: 1 h; 2 h; 3 h. B: Tempo de exposição: 3, 4, 6, 8 e 10 h. Comparação entre 10 h e 24 h de contato em solução. D: $c = 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de exposição: 1 h; 4 h; 6 h, 9h e 24 horas.	122
Figura 83. Efeito da concentração de mecloretamina, dissolvida em solução de tampão acetato, pH 4,5, no biossensor de <i>dsDNA</i> . Em todos os casos a curva (a) está relacionada ao branco. A: Comparação de diferentes concentrações de mecloretamina, (b) $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; após 6 h de contato. B: o mesmo após 24 horas de contato. C: 50 μL da solução $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, adicionados ao gel de <i>dsDNA</i> , varredura após 24 horas de contato.....	123
Figura 84. Mecanismo possível de interação do DNA no com a mecloretamina.	124
Figura 85. Trietilamina em tampão acetato, pH 4,5, no biossensor de <i>dsDNA</i> . A: Em solução, $c = 0,002 \text{ mol L}^{-1}$, após 24 horas de contato. B: 50 μL da solução $c = 0,002 \text{ mol L}^{-1}$, adicionados ao gel de <i>dsDNA</i> , varredura após 24 horas de contato.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tampões para eletrólito suporte.....	52
Tabela 2. Concentrações das soluções de mecloretamina e trietilamina adicionadas ao biossensor de <i>dsDNA</i>	58
Tabela 3. Principais parâmetros eletroquímicos. Eletrodo de Carbono Vítreo, E_p vs. $Ag AgCl 0,1\text{ molL}^{-1}\text{ Cl}^-$, $v = 0,100\text{ Vs}^{-1}$. Meio aprótico. Constantes de Hammett.	71
Tabela 4. Principais parâmetros eletroquímicos. Eletrodo de Carbono Vítreo, E_p vs. $Ag AgCl 0,1\text{ mol L}^{-1}\text{ Cl}^-$, $v = 0,100\text{ V s}^{-1}$. Meio prótico. Constantes de Hammett.	85
Tabela 5. Atividades biológicas e alguns parâmetros eletroquímicos	88

LISTA DE ABREVIATURAS

DMF	N,N-Dimetilformamida
E_{ap}	Potencial aplicado
E_F	Nível Energético de Fermi
$E_{p/2}$	Potencial a meia altura de pico
ENH	Eletrodo Normal de Hidrogênio
EO	Estresse Oxidativo
E_{pa}	Potencial de Pico Anódico
E_{pc}	Potencial de Pico Catódico
ESC	Eletrodo de calomelano saturado
GST P1-1	Glutathione transferase P1-1
i_{pa}	Corrente de Pico Anódica
i_{pc}	Corrente de Pico Catódica
TBAP	Perclorato de tetrabutilamônio
TE	Transferência eletrônica
VC	Voltametria Cíclica
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
VPN	Voltametria de Pulso Normal
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
v	Velocidade de Varredura
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
RNA	Ácido Ribonucléico
dsDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita dupla (ou dupla hélice)
ssDNA	Ácido Desoxirribonucléico em fita simples (ou simples hélice)
Ox	Espécie eletroativa na forma oxidada
Red	Espécie eletroativa na forma reduzida

RESUMO

Métodos eletroquímicos são úteis em Química Medicinal e auxiliam no esclarecimento de mecanismos de ação biológica e desempenham importante papel no estudo das relações estrutura-atividade, uma vez que os efeitos dos substituintes podem ser diretamente relacionados aos parâmetros eletroquímicos. No presente trabalho, estudos de correlação estrutura-potencial redox foram realizados, com aplicação de biossensor de DNA na investigação de interação de substâncias de diferentes classes estruturais em relação ao DNA. Compostos arilazoxilados foram estudados por voltametria cíclica, em meio prótico (aquoso/etanólico, tampão fosfato, pH 6,9) e aprótico (DMF + TBAP 0,1 mol L⁻¹). Em ambos os meios, relações lineares entre E_{p1c} (potencial da primeira onda catódica) e as constantes de substituinte $\sigma_p(\sigma^-)$ foram observadas. Os potenciais de redução correlacionam muito melhor com as constantes de substituinte $\sigma_p(\sigma^-)$, mostrando a forte influência dos fatores de ressonância no mecanismo de redução.

O estudo eletroquímico da redução do **ácido calvático** e análogo não substituído, em meio aquoso-etanólico (20% v/v), utilizando voltametria de pulso diferencial, permitiu a obtenção de gráficos de E_p vs. pH e I_p vs. pH, com estabelecimento de valores de pKa aparente para o **ácido calvático** (pKa₁ = 3,3 e pKa₂ = 7,9) e seu análogo (pKa = 6,21).

O estudo eletroquímico do **ácido calvático**, do **berenil** e da **mecloretamina**, em biossensor de dsDNA-CV, tanto em solução como incorporado na matriz do dsDNA, foi realizado. O **ácido calvático** não causa dano à molécula de DNA, pois não apareceram os picos diagnósticos de oxidação das respectivas bases, o que sugere que sua ação biológica não deve envolver o DNA como alvo. Foi possível observar o dano causado pelo **berenil** incorporado no gel de dsDNA, devido ao aparecimento de picos diagnósticos da oxidação da guanina, o que indica interação e dano à molécula de DNA, a partir de concentrações da ordem de 10⁻⁵ mol L⁻¹. Com o **berenil** em solução, o método se mostrou menos sensível. O dano causado pelo **berenil** ao DNA foi também dependente do tempo de exposição e um tempo mínimo de contato de 05 horas foi necessário. Estudos em presença de ssDNA, em carbono vítreo, permitiram evidenciar interação efetiva com a adenina, no caso do **berenil**. No caso da **mecloretamina**, foi possível detectar a interação desse agente alquilante com DNA através da observação de picos diagnósticos relacionados à oxidação das nucleobases. Os resultados permitiram definir as melhores condições experimentais, as quais são: a adição do analito diretamente no gel de dsDNA, em concentração $c > 10^{-5}$ mol L⁻¹ e deixado para secar por 24 horas.

Como o biossensor de dsDNA é facilmente preparado e fornece informações de dano ao dsDNA, em tempo razoável, ele pode ser usado como um dispositivo útil na análise de fármacos ou protótipos cujo alvo seja a molécula de DNA.

ABSTRACT

Electrochemical methods are very useful in Medicinal Chemistry and play important roles in the elucidation of the mechanism of biological action and also on the establishment of structure-electrochemical activity relationship. In the present work, we performed studies in the correlation of structure-redox potential and applied DNA biosensor in the investigation of the interaction of different substances towards DNA. Arylazoxy compounds were studied by cyclic voltammetry, in protic (aqueous/ethanolic phosphate buffer, pH 6.9) and aprotic (DMF + TBAP 0.1 mol L⁻¹) media. In both media, linear relationships between E_{pc} (potential of first cathodic wave), E_{redox} (for aprotic) and Hammett substituent constants (σ_p , σ^-) were observed. The reduction potentials correlate considerably better with (σ_p , σ^-), showing the strong influence of resonance factors in the mechanism of reduction.

The effect of pH on the reduction of calvatic acid and similar **2**, a non-substituted compound, in aqueous ethanolic solution (20% v:v), was studied through differential pulse voltammetry. The E_p and I_p vs. pH plots showed distinct regions. The apparent pKa values of 3.3 and 7.9 for **calvatic acid** and 6.21 for the unsubstituted one were obtained and were similar to the reported ones.

A double-stranded calf thymus DNA-Glassy Carbon (dsDNA-GC) biosensor was used as a model to study the possible DNA-damaging abilities of **calvatic acid**, **berenil** and **mechlorethamine** towards dsDNA, *in situ* at a charged interface. Concerning this dsDNA-GC biosensor, two ways were used for performing the experiments – one with the analytes in solution and the other with them incubated into the dsDNA gel, immobilized directly on the electrode. **Calvatic acid** does not damage dsDNA. Any diagnostic peak related to the oxidation of bases was observed. It concentrates in the dsDNA matrix. The DNA damaging abilities of **berenil** were shown. DPV-detectable DNA damage, with **berenil** incubated into the dsDNA gel, could be observed at concentrations of **1** as low as 1×10^{-5} mol dm⁻³. When **berenil** was applied to the dsDNA-GC biosensor in buffer solution, the method was much less sensitive and DPV-detectable DNA damage could be detected only at concentrations of **1** of 1×10^{-3} mol dm⁻³. This interaction was shown to be time dependent and the process was slow. ssDNA in solution, on a glassy carbon electrode was used for the analysis of the interaction of berenil, with evidence of selective interaction with adenine..

Electrochemical voltammetric *in situ* sensing of dsDNA damage caused by **mechlorethamine**, incubated into the dsDNA gel, after 24 hours contact, was possible by the appearance, in the differential pulse voltammograms, of the diagnostic peaks of the nucleobases guanine and adenine oxidation that indicate interaction and damage to DNA. The effect of concentration of mechlorethamine and its time of exposition in solution, in the presence of dsDNA-GC are also reported. With three hours of exposition, the guanine oxidation peak is already visible and concentration of mechlorethamine in the order of 10^{-5} mol L⁻¹ leads to clearly discernible diagnostic signals. From a qualitative viewpoint, preparation of the biosensor and incorporation of dsDNA gel and substrate with a contact time of 24 h would be the method of choice for the observation of interactions between berenil and DNA, and detection of consequential oxidative damage.

As the dsDNA biosensor is easily prepared and gives results for DNA damage in a reasonable time, they could be used as an analytical device to investigate potential new drugs targeting DNA.

1. INTRODUÇÃO

1.1 – ELETROQUÍMICA: ALGUNS ASPECTOS E CONCEITOS

A eletroquímica refere-se a fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que podem ocorrer homoganeamente em solução, ou heterogeneamente na superfície do eletrodo¹.

Processos eletródicos envolvem reações químicas com transferência de cargas (elétrons), através da interface de uma fase condutora (eletrodo), uma fase contígua (dupla camada elétrica) e uma fase adjacente (geralmente, solução). Na região de interface, a distribuição de carga difere daquela no interior da solução. Esse sistema eletroquímico é basicamente formado por solvente, eletrólito de suporte, substância eletroativa e eletrodos. A combinação dos vários componentes influi decisivamente no desenvolvimento da reação eletroquímica, principalmente no tocante à dupla camada elétrica (camada de pequena espessura, poucos Angstroms, na proximidade dos eletrodos).

O eletrodo pode atuar como doador (para a redução) ou receptor (para a oxidação) de elétrons transferidos para ou de espécies em solução¹. Para uma redução, há um conteúdo energético mínimo de que devem dispor os elétrons a serem transferidos, antes que a transferência ocorra. Há necessidade de similaridade energética e simetria favorável dos orbitais envolvidos na transferência eletrônica. O comportamento dos elétrons em eletrodos metálicos pode ser compreendido, em parte, pela análise do nível energético de Fermi (E_F). Os elétrons atingem a sua máxima deslocalização possível em metais; muitas vezes, eles são exemplificados como elétrons que praticamente flutuam em um mar sobre cargas positivas. Nos metais toda a condução eletrônica é essencialmente equivalente, pois os elétrons podem trocar de lugar um com o outro. No entanto, eles não têm a mesma energia, devido à limitação da mecânica quântica que diz que dois elétrons de um mesmo sistema (nesse caso o metal) não podem ter o mesmo conjunto de números quânticos. Portanto, para uma peça de metal, haverá muitos níveis energéticos próximos e os patamares de energia podem ser considerados como um *continuum* virtual, ocupados pelos elétrons disponíveis. Esses níveis energéticos não

¹ BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M.A. *Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*. Coimbra, 1996, cap. 1, p. 1-3.

são fixos e podem ser modificados pela variação do potencial elétrico aplicado (Figura 1A). Conforme a posição do nível de Fermi, em eletrodos, o processo de transferência eletrônica pode ser termodinamicamente favorecido. Pela análise da figura 1B, o E_F do metal é menos energético do que o LUMO (orbital molecular desocupado de menor energia) da espécie eletroativa Ox, sendo termodinamicamente desfavorável à transferência eletrônica do eletrodo para a molécula; contrariamente ao que se observa na figura 1C, onde ocorre a redução da espécie Ox porque os níveis energéticos E_F e o LUMO de Ox são similares. Para uma oxidação, há um conteúdo energético máximo que o nível de Fermi no eletrodo precisa ter de forma a receber elétrons de espécies em solução: esse corresponde a um potencial suficientemente positivo (em volts)^{1,2,3} (Figura 1).

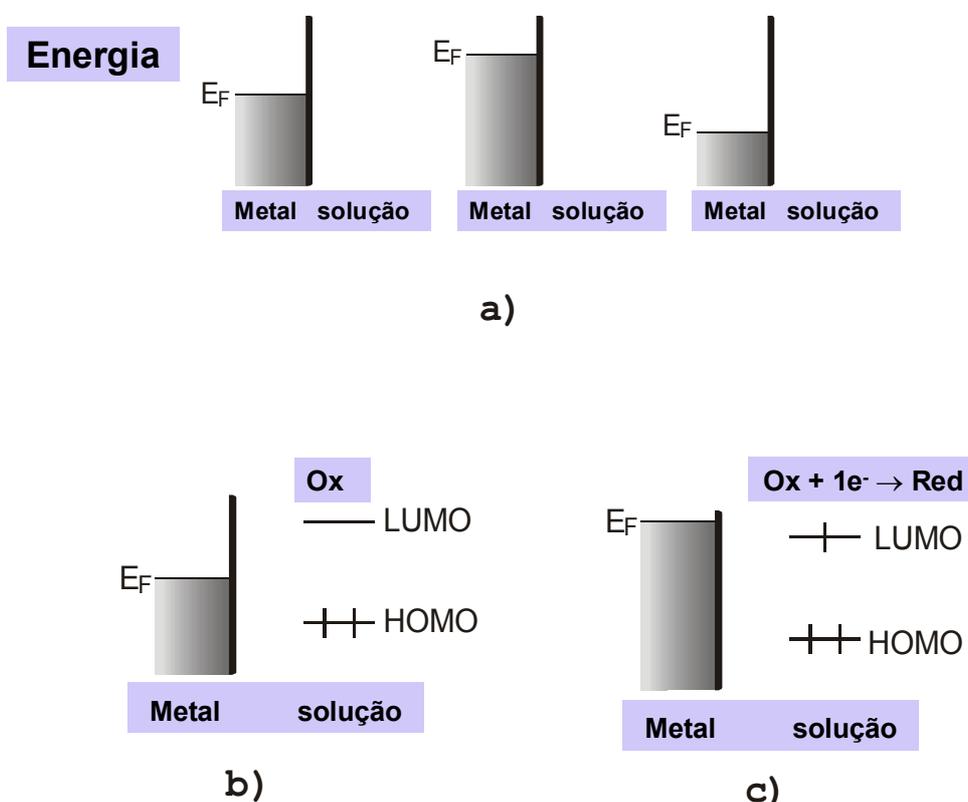


Figura 1. Representação esquemática do processo de transferência eletrônica. (a): Metais (eletrodos) com diferentes níveis energéticos de Fermi. (b): Processo de redução desfavorável. (c): Processo de redução favorável².

Quando uma transferência eletrônica ocorre através da interface metal-solução e causa oxidação ou redução, uma ou outra é regida pela lei de Faraday (a extensão de reação química provocada pelo fluxo de corrente é proporcional à

² <http://www.bath.ac.uk/~chsacf/solartron/electro/html/cv.htm>

³ White Mary Anne. *Properties of materials*. Oxford, 1999, cap.3, pág. 32-34.

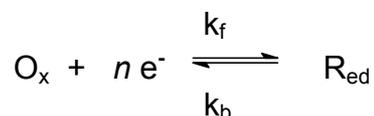
quantidade de carga) e é identificada como processo faradáico. Em algumas condições, a interface eletrodo-solução mostrará um domínio de potencial onde não há reações envolvendo transferência de cargas porque as reações são termodinâmica ou cineticamente desfavoráveis. No entanto, processos como adsorção ou dessorção podem ocorrer e a estrutura da interface eletrodo-solução pode mudar com a variação de potencial ou com a composição da solução. O processo é denominado, nesse caso, não faradaico⁴.

Células eletroquímicas em que correntes faradáicas fluem são classificadas como células galvânicas (operam de modo a produzir energia elétrica) ou eletrolíticas (consomem energia elétrica para produzir reação química)³, com utilização da equação de Faraday.

$$Q = m \frac{96487 n}{M}$$

Onde m é a massa eletrolisada, n é o número de elétrons envolvido no processo e M a massa molecular da espécie eletroativa.

Para uma reação eletródica, o equilíbrio eletroquímico



é caracterizado pela equação de Nernst

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{\text{Ox}}^*}{a_{\text{Red}}^*}$$

Onde: a_{Ox}^* e a_{Red}^* são as atividades das formas Ox e Red no seio da solução, $E^{0'}$ é o potencial formal, R é a constante dos gases ($8,316 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$), T é a temperatura em kelvins, n é o número de mols de elétrons associados ao processo de oxidação/redução e F é o faraday (96.487 coulombs por mol de elétrons).

Se as espécies oxidadas e reduzidas envolvidas numa reação eletródica se encontram em equilíbrio termodinâmico na superfície do eletrodo, a equação de

⁴ BARD, A. J.; FAULKNER, L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; Wiley; New York, 1990.

Nernst pode ser aplicada. A reação eletródica é então conhecida como uma reação *reversível*, pois, obedece à condição de reversibilidade eletroquímica.

A cinética eletródica é influenciada não apenas pela própria reação eletródica como também pelo transporte de espécies para e do interior da solução. A difusão é o movimento de íons ou espécies neutras devido à existência de gradientes de potencial químico ou gradientes de concentração. Em um sistema eletroquímico, o fenômeno de difusão pode aparecer como consequência da reação eletródica. Como a reação ocorre apenas na interface eletrodo/solução e consome o reagente na mesma região, sua concentração torna-se menor quando comparada com aquela do interior da solução. Quanto maior é a corrente, maior será o consumo de reagente e, portanto, maior será o decréscimo da concentração até que, no limite, para corrente muito elevada, a concentração superficial tenderá a zero. Em tais circunstâncias, o fenômeno difusional, que é consequência dos gradientes de concentração, pode controlar o processo.

Além da difusão, mais dois processos de transporte de massa entre a solução e a superfície do eletrodo podem ocorrer. Um desses processos é a migração de partículas carregadas em um campo elétrico. O outro é a convecção, um processo mecânico, que ocorre devido à movimentação da solução (usando-se um agitador magnético e uma barra magnética, por exemplo). O processo de migração em um campo elétrico é minimizado pela adição de um eletrólito inerte (eletrólito de suporte) à solução em uma concentração pelo menos 100 vezes maior do que a substância eletroativa. Esse eletrólito não interfere na reação eletródica e transporta quase toda a corrente na célula, eliminando problemas de resistência da solução e suprimindo potenciais de resistência do potencial total da célula. O processo de convecção pode ser eliminado mantendo-se a solução em repouso. Assim, apenas o processo de difusão será responsável pelo transporte de massa.

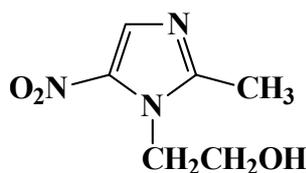
1.2 – ELETROQUÍMICA EM QUÍMICA MEDICINAL

Muitos dos mais importantes processos fisiológicos baseiam-se em cadeias oxirredutivas, envolvendo numerosos processos catalisados por enzimas. Há um conjunto de similaridades entre as reações biológicas e as eletroquímicas, em se tratando de processos de transferência eletrônica: a natureza heterogênea (interface eletrodo-solução, enzima-solução); os processos podem ocorrer tanto em meio

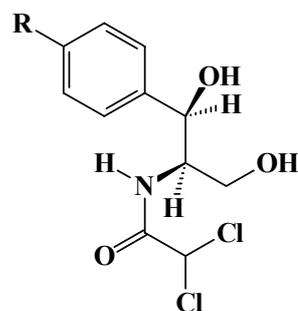
aquoso quanto não-aquoso, em temperaturas similares, ao passo que um e outro processo requerem orientação específica⁵.

Informações sobre parâmetros eletroquímicos constituem ferramentas das mais relevantes em Química Medicinal⁶.

A despeito das amplas possibilidades do processo e da complexidade da química da célula/tecido, é possível racionalizar o papel da eletroquímica no campo da Química Medicinal em um arcabouço teórico definido e não muito extenso. De maneira semelhante, as classes de compostos eletroativos, possuidores de atividades biológicas e farmacológicas não são tão numerosas. Os compostos “bioeletroativos” pertencem, na maioria das vezes, à classe dos nitroaromáticos (**I** e **II**) (ou suas formas reduzidas, **III**), das quinonas (**IV**, **V**) (ou precursores fenólicos **VI**), dos compostos quinonóides [quinonametídeos, quinonaiminas (**VII**), diquinometanos, etc., gerados *in situ* ou não], dos compostos aza [pigmentos azo ou suas formas reduzidas (hidrazo) e oxidadas (azoxi) (**VIII**)], dos sais de imínio (ou iminas), dos N-óxidos aromáticos (**IX**) e alifáticos, dos corantes triarilmetínicos (**X**), dos sais N-heterocíclicos (**XI**), dos peróxidos (**XII**), dos complexos metálicos (**XIII**, **XIV**), dos compostos organometálicos (**XV**), entre outros. Alguns exemplos são colocados na figura 2.



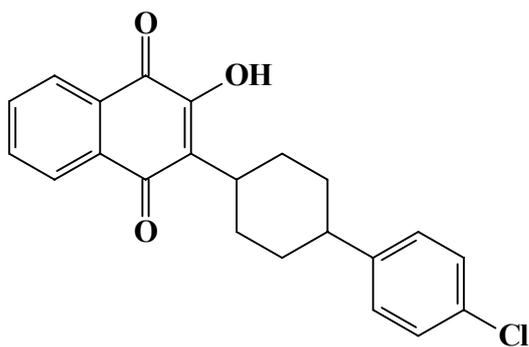
Metronidazol (I)



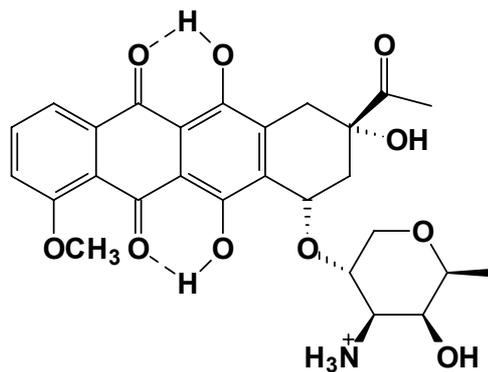
Cloranfenicol R = NO₂ (II), R = NO (III)

⁵ DRYHURST, G. *Electrochemistry of Biological Molecules*, Academic Press, New York, **1977**, cap. 1, p. 1-5.

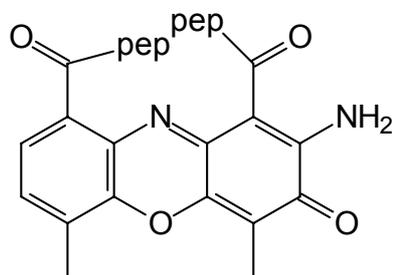
⁶ DE ABREU, F. C. *et al. J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, 19.



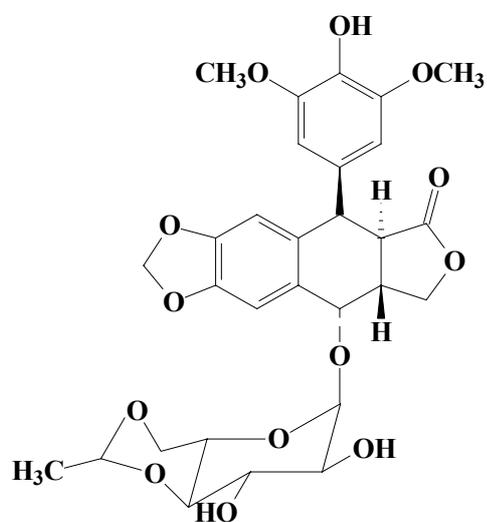
Atovacona (IV)



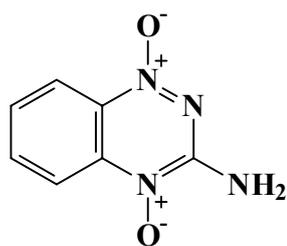
Danoumicina (V)



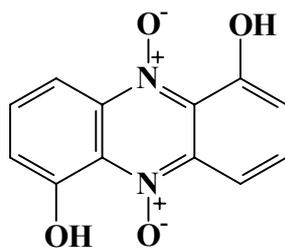
Actinomicina (parte) (VI)



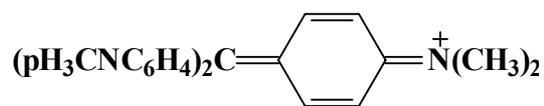
Etoposídeo (VII)



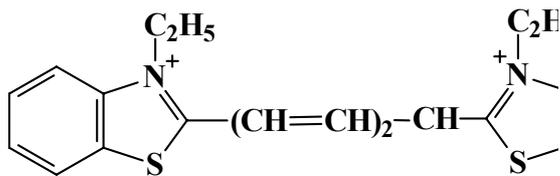
Tirapazamina (VIII)



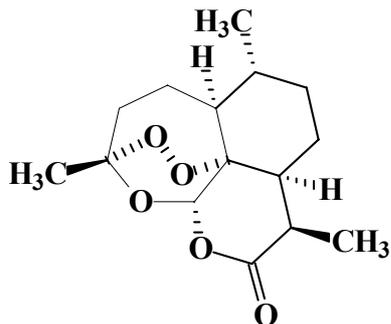
Iodinina (IX)



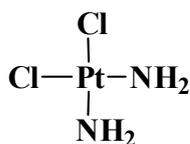
X



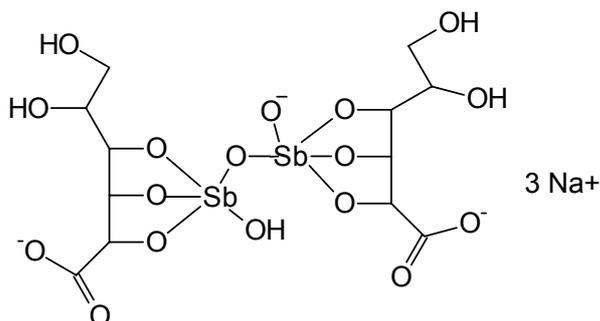
Ditiazanina (XI)



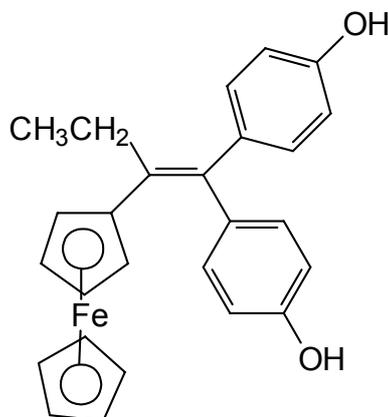
Artemisinina (XII)



Cis-platina (XIII)



XIV



XV

Figura 2. Algumas substâncias bioeletroativas

Em relação aos mecanismos de ação biológicos, um dos mais importantes é relacionado ao duo Transferência Eletrônica-Estresse Oxidativo (TE-EO)⁷ (Figura 3). A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. ERO e ERN têm importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar

⁷ KOVACIC, P., BECVAR, L. E. *Curr. Pharm. Des.*, **2000**, 6, 143.

o agente agressor. Por outro lado, quando sua produção é danosa, o organismo dispõe de um eficiente sistema anti-oxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e anti-oxidante^{8,9}, com predomínio dos oxidantes, com dano conseqüente em relação às macro- e micromoléculas biológicas.

Uma larga variedade de moléculas (naturais ou sintéticas) tem a capacidade de, após TE, gerar espécies reativas oxigenadas tóxicas ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet}) (Figura 3). Um dos requisitos para essa atividade é a possibilidade de reversibilidade eletroquímica.

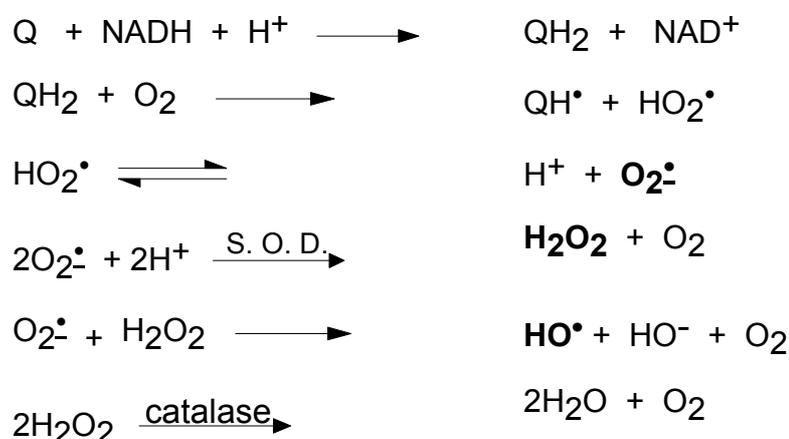


Figura 3. Atuação de quinonas na geração de espécies oxigenadas reativas (EOR) e destoxificação, pelo emprego de catalase e superóxido-dismutase (SOD). Várias outras moléculas podem exercer papel semelhante, como nitroaromáticos, sais de imínio e compostos quinonóides.

Um número significativo de substâncias fisiologicamente ativas age via TE-EO. Essas substâncias mostram valores de $E_{1/2}$ maiores (menos negativos) do que $-0,5$ V vs. ENH, em faixa de potencial ótima para permitir captura eletrônica a partir de doadores biológicos, principalmente enzimas, ou, podem fornecer, via modificações metabólicas, derivados facilmente redutíveis^{6,10}.

A alquilação após processos bioredox é o segundo dos mecanismos principais e descreve o efeito de compostos, que expressam seu modo de ação farmacológica como agentes alquilantes, mas o fazem após redução ou oxidação *in vivo*. A grande maioria dos agentes alquilantes empregados clinicamente são pró-fármacos e se comportam como armadilhas eletrofílicas para nucleófilos moleculares

⁸ SCHAFFER, F.Q.; BUETTNER, G. R.; *Free Radic Biol Med.* **2001**, 30, 1191.

⁹ FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J.; *Nature.* **2000**, 408, 239.

¹⁰ KOVACIC, P., OSUNA JR. J. A. *Curr. Pharm. Des.* **2000**, 6, 277.

ou endobióticos, após redução ou oxidação catalisada ou não por enzimas¹¹. Os dois mecanismos, TE-EO ou alquilação bioredox, não são mutuamente exclusivos e podem ocorrer simultaneamente. A predominância de um sobre o outro depende do conteúdo de oxigênio dos sistemas biológicos envolvidos (Figura 4).

Nesse contexto, é indispensável comentar-se sobre hipóxia e sobre as diferentes terapias cujos alvos são as regiões hipóxicas de tumores, principalmente tumores sólidos. Hipóxia (conteúdo de oxigênio relativamente baixo) ocorre em várias regiões de tumores, em eventos isquêmicos e em artrite. Nos casos de câncer, tumores sólidos contêm uma proporção de células que são transitória ou cronicamente hipóxicas⁷. A hipóxia ocorre em várias condições patológicas. Resulta de uma vascularização inadequada e desorganizada. O sangue transfere menos oxigênio às células dessas regiões do que para as demais. Em tumores humanos, a hipóxia parece estar associada à ocorrência de metástase e à progressão maligna¹². Devido a sua inacessibilidade a fármacos, essas células representam um problema clínico na quimioterapia de tumores. Células hipóxicas são mais resistentes à radiação do que células bem-oxigenadas e essa resistência pode contribuir para o fracasso da radioterapia local. Há um grande interesse no desenvolvimento de compostos seletivamente tóxicos a células hipóxicas (ASH, agentes seletivos à hipóxia), pois, a hipóxia em tumores pode ser considerada pura e simplesmente uma questão de vida ou morte¹³.

Os fármacos ativados em situações de hipóxia apresentam amplas aplicações, principalmente, por suplantarem a resistência de células tumorais hipóxicas à radioterapia. As propriedades-chave de tais fármacos incluem propriedades redox apropriadas para ativação por redutases biológicas (tipicamente flavoproteínas) e para reação com oxigênio de tal modo que níveis normais de oxigênio possam inibir ou reverter o processo de redução (Figura 4)¹¹.

¹¹ RAJSKI, S. R., WILLIAMS, R. M.: *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2723.

¹² SINHABABU, A. K., THAKKER, D. R.: *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, 19, 241.

¹³ WARDMAN, P.: *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 739.

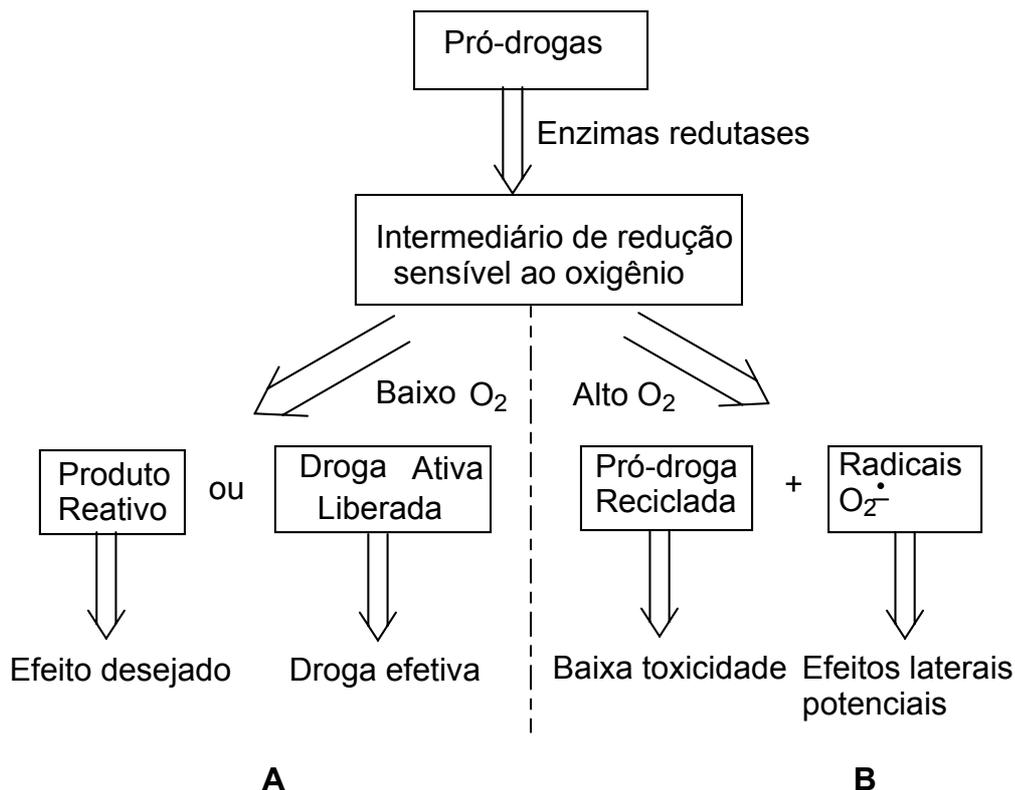


Figura 4. Representação de mecanismos pelos quais pró-fármacos ativados por biorredução exercem suas atividades farmacológicas. A: Ativação seletiva em hipóxia; B: Ativação em condições normais, geração do Estresse Oxidativo. Adaptado da referência¹¹.

Um exemplo típico da importância da redução na bioalquilação é o que ocorre com aziridinas (**XVI**) (Figura 5). A distribuição eletrônica resultante da redução realça substancialmente a basicidade dos nitrogênios da aziridina, facilitando, assim, a protonação de cada uma das aminas terciárias. A ativação do anel aziridínico, em seqüência à redução da quinona, leva à formação de centros eletrofílicos que podem alquilar, bem como formar ligações cruzadas intra-fitas no DNA. A auto-oxidação de retorno à quinona (**XVII**) é favorecida devido ao aumento do caráter eletrodoador dos substituintes.

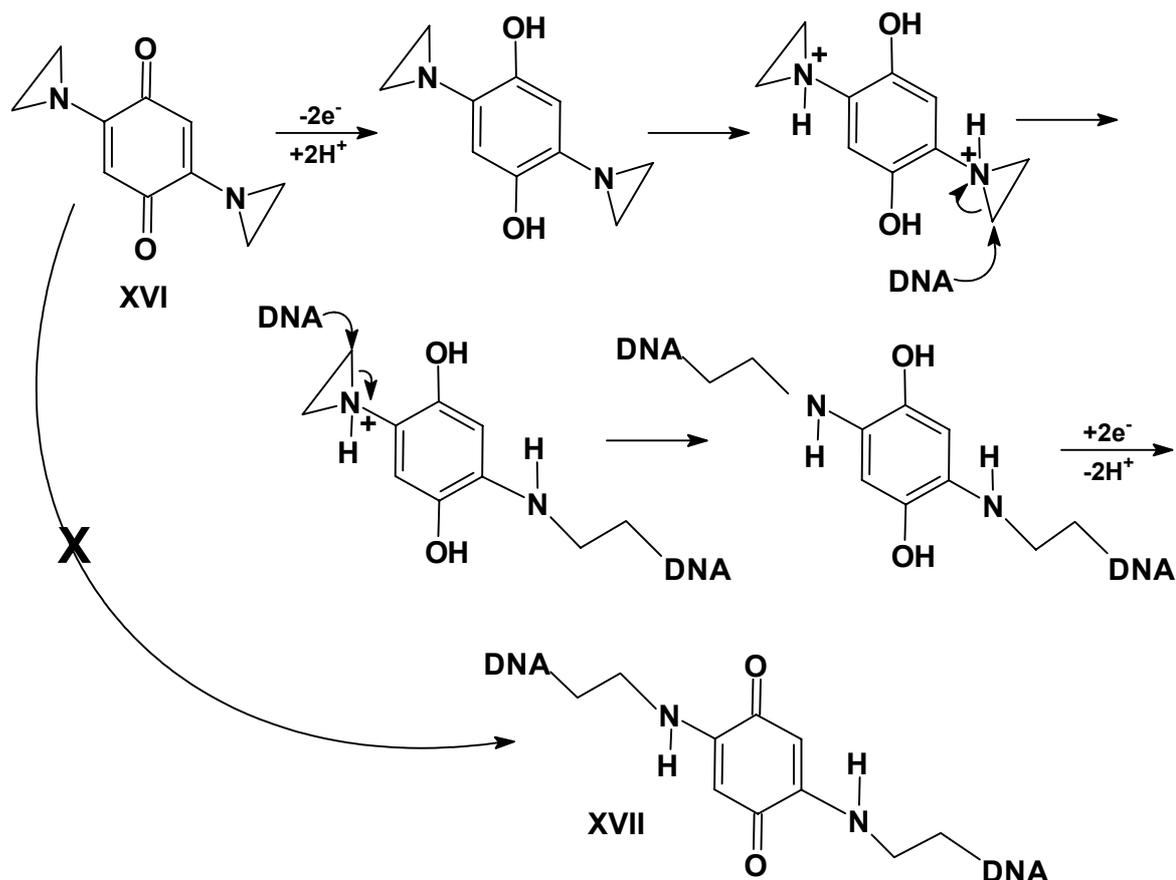


Figura 5. Mecanismo redutivo de formação de ligações intra-fitas no DNA, a partir de diaziridinilquinonas (XVI). Adaptado da referência⁸.

Em relação à oxidação, existem vários exemplos, como é o caso do etoposídeo (VII) e do ferrocifeno XV (Figuras 6 e 7).

O Etoposídeo (VII), um fármaco anti-câncer utilizado largamente, é também citotóxico, propriedade associada à reação com o complexo topoisomerase II/DNA e formação de ligações cruzadas proteína-DNA. O etoposídeo é metabolizado a produtos altamente reativos, entre eles, uma *orto*-quinona, responsável pela inibição da topoisomerase II (Figura 6)¹⁴.

O ferrocifeno XV é um composto organometálico ferrocenílico, análogo ao tamoxifeno e apresenta atividades antiproliferativas contra células cancerosas do seio, hormônio-independentes (sem receptor de estrogênio), células do tipo MDA-MB231. Sua atividade citotóxica inclui metabolismo oxidativo para gerar *orto*-quinonas, quinonametídeos ou carbocátions, que podem reagir com DNA, GSH e proteínas (Figura 7). O ferroceno é oxidado mais facilmente que o fenol. Daí, a oxidação pode ocorrer em sítios distantes do sítio de ação biológico. O grupo

¹⁴ GANTCHEV, T.G.; HUNTING, D.J. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, 422.

ferrocenila funciona como uma antena eletrônica e pode servir como um transportador intramolecular do “buraco” (centro eletropositivo da molécula), enquanto a molécula percorre o caminho até o sítio de ação biológica. Em presença de bases adequadas (nucleobases ou peptídeos), ocorre desprotonação e nessas condições, há possibilidade de oxidação do ânion fenolato a radical neutro fenoxila, provavelmente, de uma maneira sincronizada. Há oxidação subsequente e o quinonametídeo gerado é eletrofílico suficiente para reagir com grupos nucleofílicos de endobióticos, o que pode levar a morte celular¹⁵.

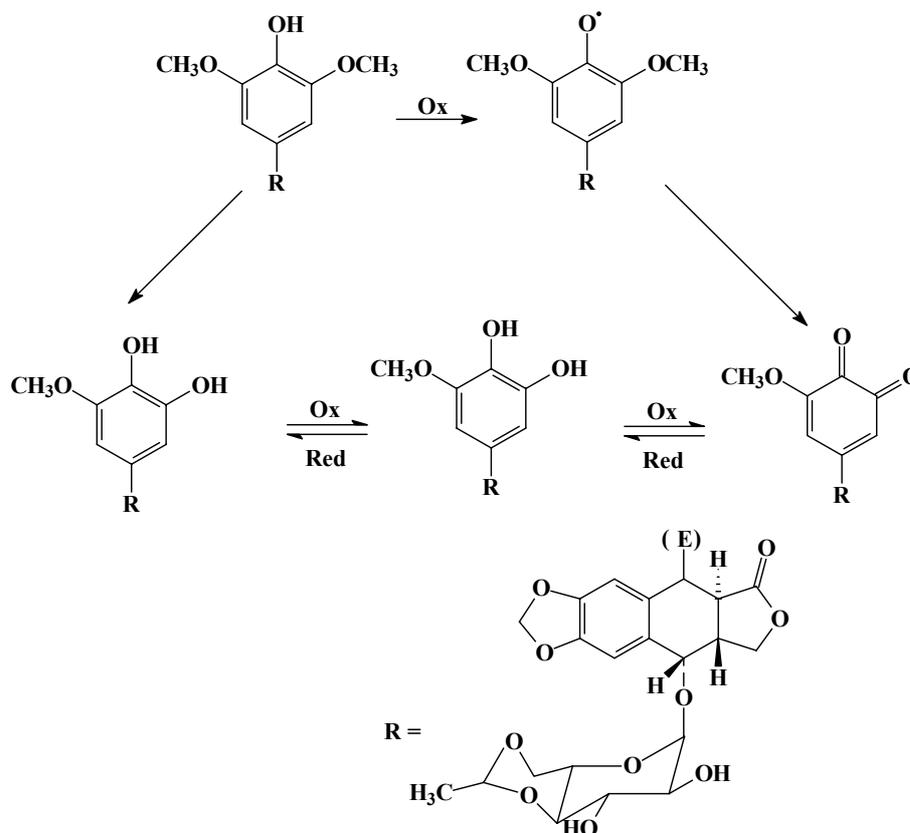


Figura 6. Principais passos redox para a transformação metabólica do etoposídeo (VII) mediada por mono-oxigenase/peroxidase P450. Essas transformações alteram o grupo dimetoxifenol¹⁴.

¹⁵ HILLARD, E. *et al.*; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 285-290.

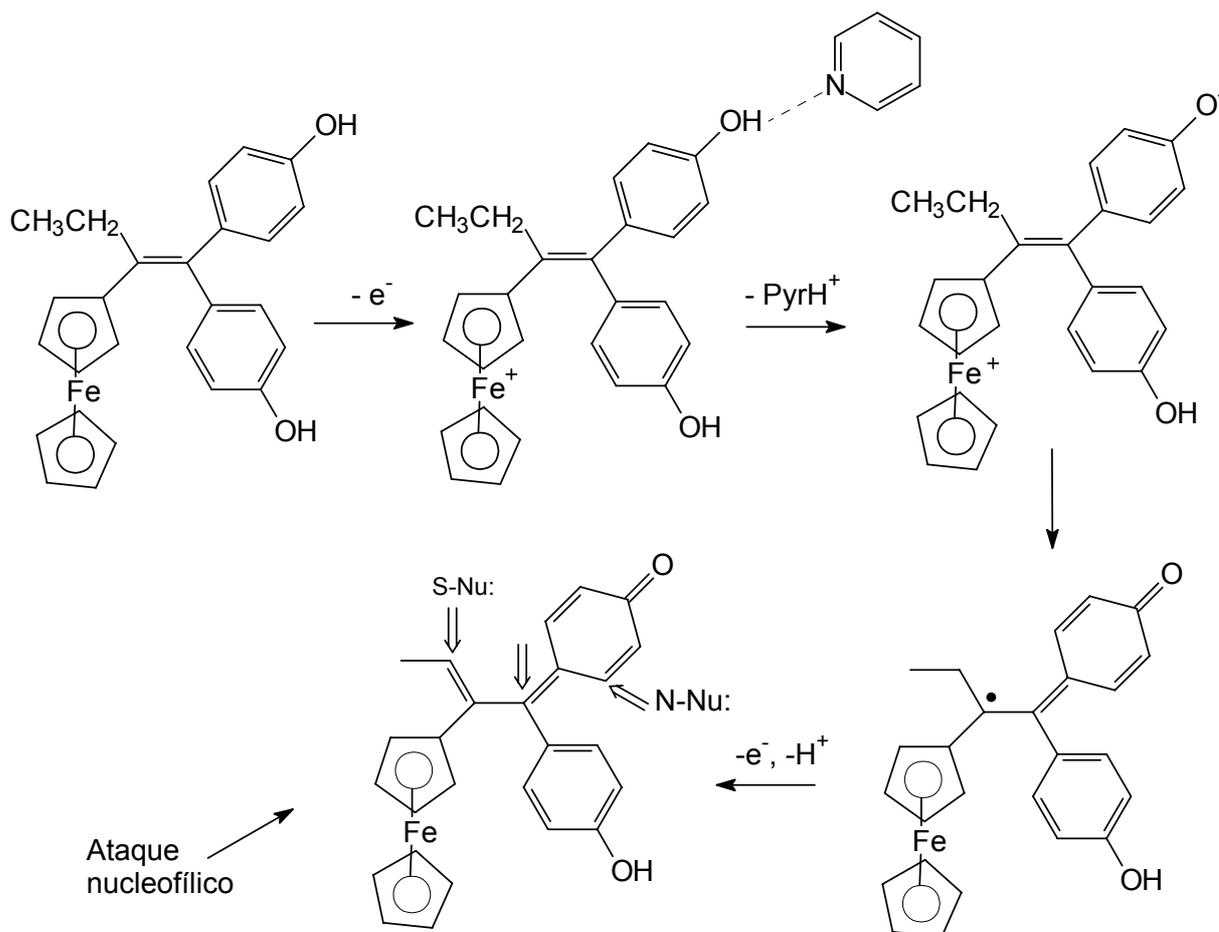


Figura 7. Proposta mecanística para a transformação do ferrocifeno XV em quinonametídeo XVIII, provável espécie reativa. O ataque nucleofílico pode ser realizados em regiões distintas¹⁵.

De modo geral, como visto nas seções anteriores, o câncer é a doença-alvo para a maioria dos fármacos, protótipos e pro-fármacos listados nas seções anteriores. É a área onde a maioria dos estudos de correlação entre parâmetros eletroquímicos e atividade biológica foi e é realizada.

O câncer é basicamente uma doença de células, caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle que dirigem a proliferação e a diferenciação celulares. As células que sofreram transformação neoplásica proliferam excessivamente e formam tumores locais que podem comprimir ou invadir estruturas normais adjacentes¹⁶.

Ao contrário da percepção popular, a estrutura de um tumor não consiste, simplesmente, em um aglomerado de células em constante proliferação. As células neoplásicas freqüentemente ocupam menos da metade do volume total do tumor. Os

¹⁶ KATZUNG, B. C.; *Farmacologia Básica e Clínica*, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **1994**, p. 579.

vasos sangüíneos que se entrelaçam dentro da massa tumoral preenchem 1 a 10% do volume do tumor. O espaço restante é preenchido por matriz rica em colágeno $\frac{3}{4}$, o interstício $\frac{3}{4}$ que envolve as células neoplásicas e pode separá-las da vascularização¹⁷.

Inicialmente, o abastecimento sangüíneo do tumor é realizado através da vascularização existente na região. Durante o crescimento do tumor, alguns dos vasos sangüíneos pré-existentes são obstruídos ou comprimidos. Posteriormente, pequenos vasos sangüíneos começam a surgir (neovascularização) e estes se ramificam excessivamente, são tortuosos e seguem em direções imprevisíveis. Conseqüentemente, algumas áreas do tumor são bem irrigadas, outras têm pouca ou nenhuma vascularização, o que faz com que o aporte de oxigênio e nutrientes para algumas regiões do tumor seja muito menos eficiente do que nos tecidos normais. As células localizadas próximas aos vasos sangüíneos (periferia do tumor) são células bem oxigenadas. As células localizadas no centro do tumor e, portanto, distantes da vascularização, são células anóxicas e necróticas. Finalmente, as células existentes entre estas duas regiões são conhecidas como células em hipóxia, pois estão localizadas em uma região de baixa concentração de oxigênio (Figura 8)^{17,18}.

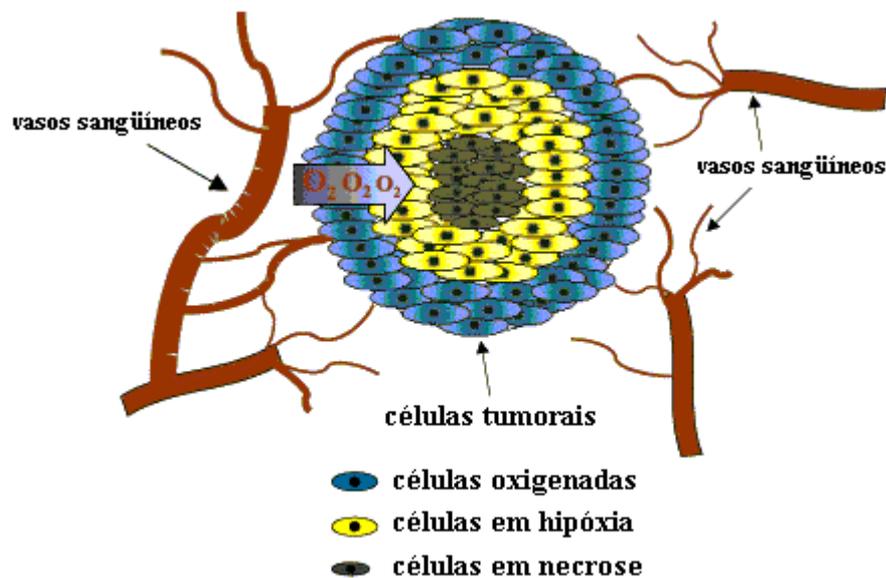


Figura 8. Secção transversal de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância capilar (adaptado da referência¹⁹).

¹⁷ JAIN, R. K.; *Scientific Amer.* **1994**, 271, 42.

¹⁸ BROWN, J. M.; GIACCIA, A. J.; *Cancer Res.* **1998**, 58, 1408.

¹⁹ KENNEDY, K. A.; *et al.*; *Biochem. Pharmacol.* **1980**, 29, 1.

Em resumo, a atividade biológica de substâncias anti-câncer varia com o sistema tumoral, com fármacos hidrofílicos utilizados em terapia intracavitária, enquanto um derivado lipofílico é direcionado para neoplasma localizados, na tendência a minimizar toxicidade sistêmica; é relacionada ao grau de oxigenação dos tecidos (Figuras 4, 8 e 9) e depende do pH, que exerce forte influência reguladora em processos celulares.

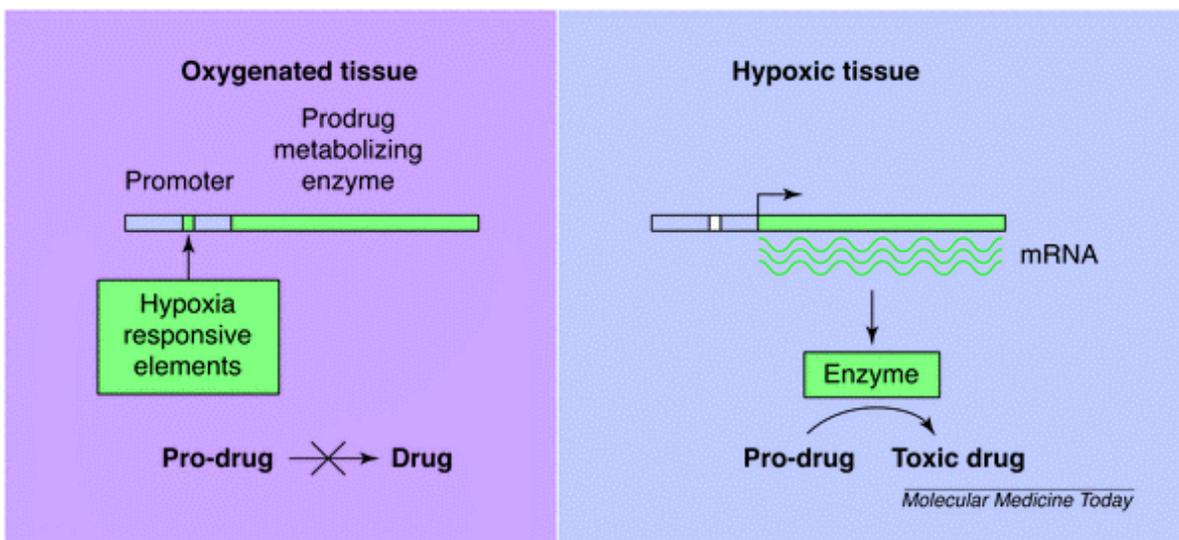


Figura 9. Diferença de mecanismo de ação biológica em função do conteúdo de oxigênio celular.

Como visto, há um forte compromisso entre a atividade biológica e parâmetros eletroquímicos.

Atividade ótima pode ser alcançada quando o potencial de redução monoelétrônico do agente ativo biologicamente se situa na faixa intermediária entre as dos redutores celulares, cerca de $-0,4$ V vs. ENH, e aquela da reação O_2/O_2^\bullet , cerca de $-0,2$ V vs. ENH em pH 7, embora essa faixa possa se estender ligeiramente por efeitos Nernstianos de concentração ou por efeitos cinéticos da rápida re-oxidação dos íons-radicaais intermediários (Figura 9). Uma correlação linear entre o log da velocidade e os potenciais de redução dificilmente é obtida, mas, em vários casos, o ponto de corte é claramente demonstrado ($-0,55$ V vs. ENH). A figura 10 exemplifica a importância da comparação dos potenciais dos sistemas enzimáticos (pH 7 vs. ENH) e potenciais de redução E_7^1 de xenobióticos²⁰. Os exemplos pertencem às classes mostradas na figura 2.

²⁰ LIVERTOUX, M-H, LAGRANGE, P., MINN, A.: *Brain Res.* **1996**, 725, 207.

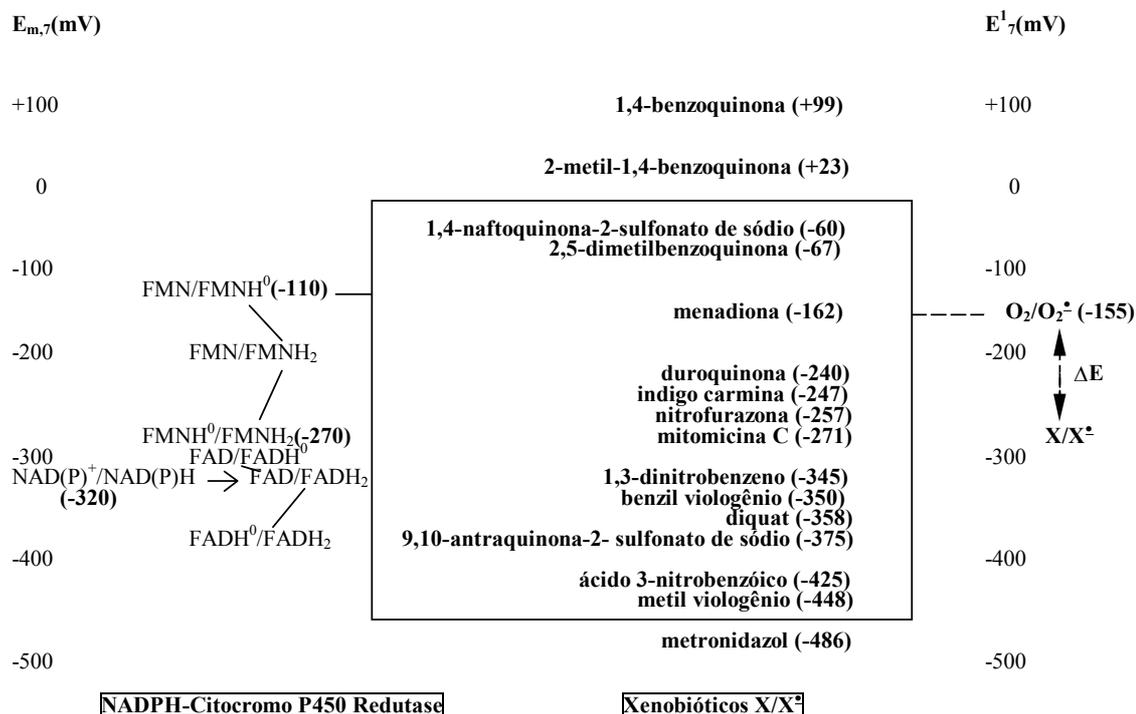
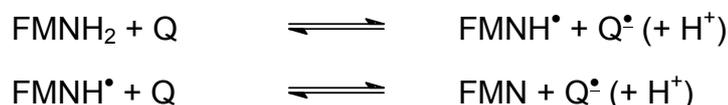


Figura 10. Potenciais redox (pH 7,0) da redutase NADPH-citocromo P-450 (FAD-FMN, $E_{m,7}$) e potenciais de redução monoelétrônicos de xenobióticos (E^1_7). Os valores para as enzimas foram determinados por Iyanagi e colaboradores e os dos produtos químicos são valores da literatura. Adaptado da referência²⁰.

Como ilustração, o equilíbrio no processo de transferência eletrônica para a redução de substâncias bioativas, exemplificado por quinonas (Q) e pelo sistema enzimático baseado no cofator mononucleotídico da flavina (FMN (XIX) e FMNH₂ (XX)] é termodinamicamente favorável (i.e. $K > 1$) se $E(Q/Q^{\bullet-}) > E(FMNH^{\bullet}, H^+/FMNH_2)$ ou $E(FMN, H^+/FMNH^{\bullet})$, respectivamente (equações abaixo).



É importante reconhecer que reações com constantes de equilíbrio $\ll 1$ podem ocorrer se qualquer dos produtos for removido do equilíbrio, por quaisquer outras reações, como no caso de intermediários instáveis. Adicionalmente, a redução, mesmo em pequena extensão, pode ser suficiente para desencadear a citotoxicidade¹³.

Dependendo do grupo funcional farmacofórico, há diferenças: os potenciais de redução de quinonas farmacologicamente ativas são de modo geral mais altos que o de nitroaromáticos e os de sal de imínio (Figura 10). Sistemas enzimáticos apropriados são utilizados em meio biológico. Uma discussão mais profunda acerca desses aspectos não é possível, nesse caso; no entanto, como norma prática, os sistemas da flavina (**FNM**, **FNMH₂**) ou de flavoproteínas (Figura 11) reduzem, por transferência de um elétron, compostos com E_{redox} da ordem de $-0,4$ V vs. ENH ou maior⁹.

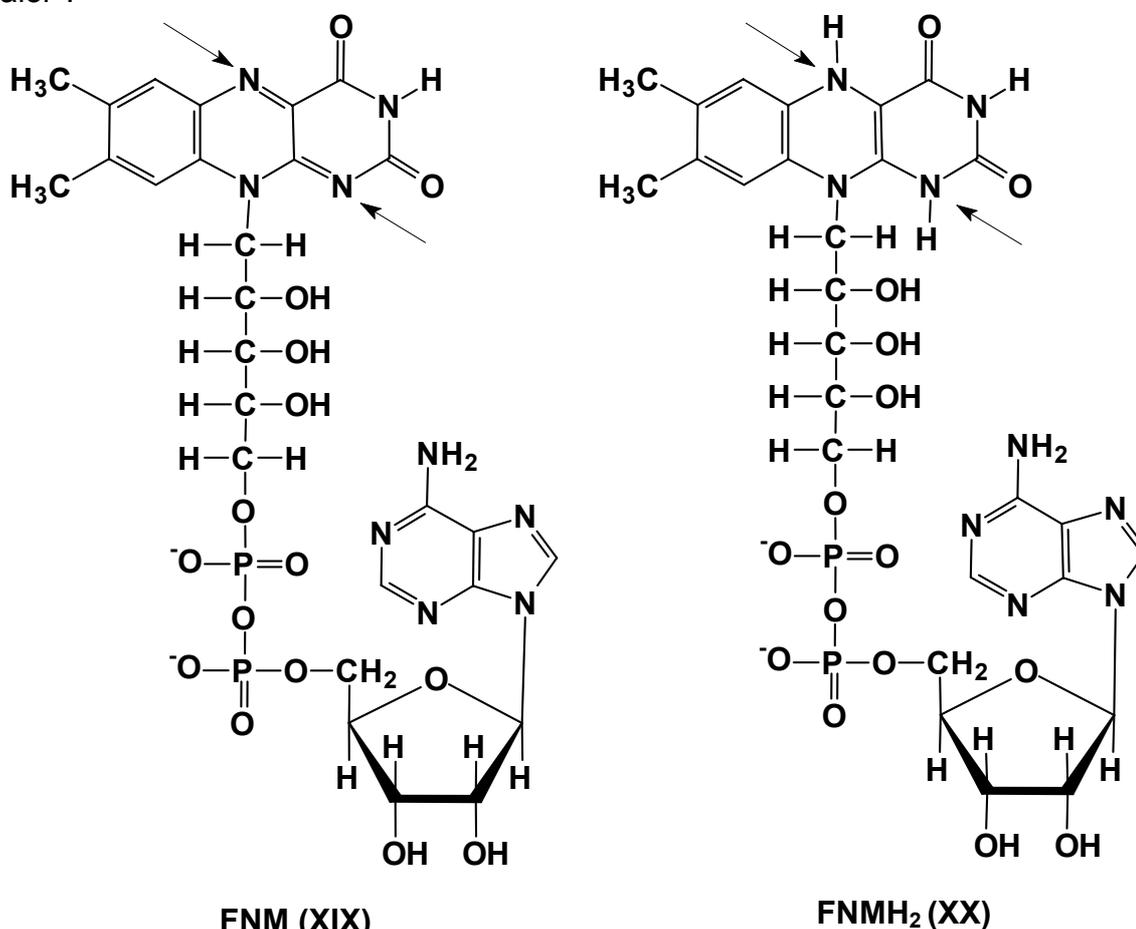
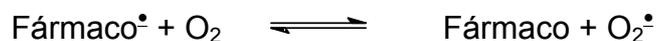


Figura 11. Estruturas dos cofatores mononucleotídeos da flavina.

Após redução, há de se considerar a reação com O_2 , gerando O_2^{\bullet} (Figuras 3 e 4), com potenciais de redução dependentes do conteúdo de oxigênio ($E = -0,18$ V (se $[\text{O}_2] = 1 \text{ mol dm}^{-3}$) ou $-0,35$ V (se $p_{\text{O}_2} = 1 \text{ atm}$) vs. ENH²¹. O primeiro valor é mais apropriado para comparações.

²¹ WARDMAN, P.: *J. Phys. Chem. Ref. Data*. **1989**, *18*, 1637.

No caso de fármacos geradores do estresse oxidativo (Figura 3, Figura 4B), os potenciais de redução monoeletrônica controlam a posição do equilíbrio.



Considerando-se a constante de equilíbrio para a equação acima como $K_3 = 10^{\Delta E/0,06}$, aproximadamente, para $K_3 > 1$, teríamos E (fármaco/fármaco $^\bullet$) $< -0,2$ V vs. ENH, sendo o processo TE-EO desfavorecido em potenciais mais positivos, embora possa ocorrer, em caso de consumo de O_2^\bullet , pela presença, por exemplo de SOD (superóxido dismutase)¹³. Daí, supondo o potencial de redução mínimo necessário para ativação de flavoproteínas e o potencial máximo de proteção contra redução do oxigênio, o potencial de redução necessário para uso em terapias biorredutivas (Figura 2) estaria na região de potencial entre $-0,5$ a $-0,1$ V (vs ENH, em água, em pH 7), ou de $-0,230$ V a $-0,700$ V vs. ESC^{13,20}.

Estudos semelhantes em meio aprótico são realizados. Esses ensaios mostram-se relevantes, como no caso da NAD(P)H-Citocromo P-450 redutase e muitos outros, pois os ambientes das membranas biológicas são tanto polares como lipofílicos, uma vez que a flavoproteína encontra-se ancorada na dupla camada fosfolipídica do retículo endoplasmático via peptídeo amino-terminal hidrofóbico e encontra-se exposta na face citoplasmática desse sistema de membrana. Os potenciais de redução medidos em meio aprótico são, de modo geral, e em relação ao meio aquoso, mais negativos. Meios próticos permitem a transferência de prótons aos intermediários eletrogerados, estabilizando-os e facilitando o processo de redução. Os valores anteriormente estabelecidos para meio aquoso assumem valores mais negativos, em meio aprótico, na faixa útil de $E_{\text{redox}} = -0,700$ a $-1,100$ V²⁰.

Os aspectos exclusivamente termodinâmicos não são, na maioria das vezes, suficientes, para a compreensão da atividade farmacológica de fármacos. Aspectos cinéticos revelam-se extremamente importantes na liberação de fármacos ativos ou na geração do Estresse Oxidativo nos sítios-alvo. Moléculas com baixa afinidade

eletrônica (potenciais de redução mais negativos) são ativadas inadequadamente por enzimas, enquanto moléculas facilmente redutíveis podem ser rapidamente metabolizadas ou excretadas ou ainda ativadas fora do alvo²². O potencial de redução do fármaco (que pode controlar a velocidade de reação), o pK_a do radical e a natureza cinética desse último podem influenciar tanto a atividade quanto a seletividade da fármaco²³. A equação abaixo correlaciona a dependência entre os parâmetros cinéticos e os termodinâmicos¹³.

$$\text{Log (velocidade de redução)} = \text{constante} + (\text{dependência redox} \times E_p)$$

Uma área adicional em que a eletroquímica pode desempenhar um papel mais geral refere-se ao estudo das relações estrutura-atividade, uma vez que os efeitos dos substituintes podem ser diretamente relacionados aos parâmetros eletroquímicos²⁴. Essa correlação permite estender os limites das medidas experimentais e prever propriedades redox, com alto grau de confiança. Essa característica facilita a identificação de relações quantitativas entre estrutura e atividade farmacológica e auxilia no planejamento de derivados de fármacos mais ativos, mais seletivos e menos tóxicos. Há problemas quando os grupos substituintes apresentam grupos ionizáveis ou sítios propícios a protonação²⁵. Efeitos prototrópicos alteram drasticamente o potencial, principalmente em meio aquoso. Os potenciais de redução mostram-se dependentes do pH. É necessário traçar-se um perfil de redução em relação ao pH. Tanto o meio aquoso quanto o aprótico devem ser considerados, pois há alteração significativa dos mecanismos em diferentes ambientes, em relação ao conteúdo hidrogeniônico do meio. Em ausência desses fatores complicadores e, em condições semelhantes, é possível estabelecer a correlação entre as constantes dos substituintes e os potenciais redox²⁵.

Os potenciais de redução fornecem informações sobre a viabilidade dos processos de transferência eletrônica (TE) *in vivo*. Correlações já divulgadas na literatura entre E_{pc} (potencial de redução catódico), $E_{1/2}$ (potencial de meia-onda) ou E_{redox} (potencial redox) e atividades biológicas demonstram a relevância de estudos eletroquímicos como ferramentas úteis na elucidação do mecanismo de

²² KELSON, B., *et al.*: *Anti-Canc. Drug Des.* **1998**, *13*, 575.

²³ IYANAGI, T., MAKINO, N., MASON, H. S.: *Biochem.* **1974**, *13*, 1701.

²⁴ ZUMAN, P.: "*Substituents Effects in Organic Polarography*" Plenum Press: New York, **1967**, caps. I, II and VIII, pp.1-21; 23-41; 273-308.

²⁵ WARDMAN, P.: In "*Selective Activation of Drugs by Redox Processes*" Adams, G. E., Breccia, A., Fielden, E. M., Wardman, P., eds. Plenum Press: New York, **1990**, 11.

ação de várias drogas contra várias doenças, na previsão e planejamento de compostos biologicamente ativos^{7,8}. O ambiente celular pode ser hidrofílico ou lipofílico. Para mimetizá-lo, os estudos dos processos redox devem ser realizados em meio aprótico, similar a sistemas lipofílicos, ou prótico, para imitar ambientes hidrofílicos, o que simula situações em vários fluidos biológicos⁶.

Mudanças estruturais afetam curvas voltamétricas de diferentes maneiras. Elas podem causar deslocamentos em potenciais redox ou podem afetar os coeficientes de difusão, com reflexos em correntes-limite. Podem também ocasionar mudanças no mecanismo eletródico, na reversibilidade e na cinética reacionais. O efeito do substituinte pode ser, na maioria das vezes, relacionado diretamente com parâmetros eletroquímicos. Essa correlação permite estender o limite das medidas experimentais e, portanto, pode prever, com segurança, propriedades redox de um grupo bem mais amplo de compostos, o que facilita a identificação de relações quantitativas entre estrutura e atividade biológica. Em relação a azoxi derivados, uma relação linear entre $E_{1/2(\text{red})} - E_{1/2(\text{ox})}$ e os valores de Hammett σ/σ^- foram estabelecidos²⁶.

Nos últimos anos, efeito de substituintes sobre os valores de $E_{1/2}$ foram correlacionados com uma série de parâmetros, incluindo as constantes de substituintes σ de Hammett. Geralmente, as equações que descrevem a influência dos efeitos do substituinte eletrônico, em uma reação química particular, em relação ao composto padrão não substituído são do tipo da equação de Hammett:

$$\log (k/k_0) = \rho\sigma$$

Onde k é a velocidade ou a constante de equilíbrio da reação química particular do composto substituído e k_0 aquela do composto de referência; σ é o parâmetro eletrônico do substituinte de interesse e a constante reacional ρ indica a sensibilidade reacional aos efeitos eletrônicos.

Os valores numéricos dos termos σ e ρ são definidos por uma reação específica, que é a ionização do ácido benzóico, como a reação padrão para a qual a constante reacional ρ é fixada. A constante do substituinte, σ , pode, então, ser determinada para uma série de grupos substituintes pela medida da constante de dissociação ácida do ácido benzóico substituído. Os valores definidos de σ são

²⁶ KUBOTA, T. *et al. Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1979**, 52, 1588.

utilizados na correlação de outras séries de reações, e, assim, os valores de ρ para as reações são determinados²⁷.

Os valores de σ refletem o efeito que cada grupo substituinte tem na energia livre de dissociação do ácido benzóico substituído. O efeito do substituinte resulta de uma combinação de fatores. Entre eles tem-se: efeito ressonante, efeito de campo e efeito indutivo. A equação de Hammett é livre de complicações devido a efeitos estéricos, desde que ela se aplica somente a substituintes nas posições *meta* e *para*. Em adição aos valores σ_m e σ_p usados com a equação clássica de Hammett, temos os valores de σ^+ e σ^- . Estes são grupos de constantes do substituinte que reconhecem que a participação ressonante pode variar para reações diferentes. Os valores σ^+ são usados para reações em que há uma interação ressonante direta entre o substituinte eletro-doador e um centro reacional catiônico, ao passo que o grupo σ^- é relativo a reações em que há uma interação ressonante direta entre o substituinte e um sítio reacional rico em elétrons²⁷.

Uma série de alterações foi feita e o tratamento atual mais elaborado e acurado é representado pela equação do parâmetro dual do substituinte:

$$\log (k/k_0) = \rho_I\sigma_I + \rho_R\sigma_R$$

Onde σ_I e σ_R são constantes reacionais que refletem a sensibilidade do sistema aos efeitos polares e ressonantes, respectivamente²⁷.

O sinal e a magnitude de σ para um grupo substituinte é uma medida da sua capacidade de perturbar eletronicamente seu ambiente. Valores diferentes da constante do substituinte são requeridos para o mesmo grupo substituinte de acordo com a posição, *meta* ou *para*, que o mesmo ocupe no anel benzênico.

Em termos qualitativos, a presença de substituintes eletrodoadores dificulta o processo de redução e grupos eletrorretiradores influenciam na direção oposta, facilitando a redução; em oxidação, os efeitos são opostos.

1.3 – DETERMINAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE FÁRMACOS

Técnicas eletroquímicas têm sido utilizadas para ajudar a esclarecer mecanismos de ação de fármacos. A principal contribuição acopla dispositivos

²⁷ CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J.; *Advanced Organic Chemistry*, 4.ed., Plenum Press, New York, Parte A, **2000**, cap. 4, pp 204-215.

eletroquímicos e métodos usados para analisar radicais livres, principalmente espectroscopia de ressonância do spin eletrônico²⁸. A importância da eletroquímica no estudo desses sistemas redox é que é um sistema químico relativamente limpo, fácil de controlar e pode ser estudado em soluções apróticas e aquosas que permitem avaliar o comportamento de radicais livres gerados em sistemas biológicos²⁸.

Modificação covalente no DNA por agentes antineoplásicos representa uma lesão bioquímica grave, que pode exercer papel fundamental em mecanismo de ação de fármacos. A habilidade em medir níveis de modificações covalentes em DNA em células alvo *in vivo* pode, no entanto, ser vista como uma forma de monitorar a eficiência terapêutica de fármacos. A estratégia eletroquímica pode auxiliar nesses aspectos. Há um entusiasmo considerável sobre o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para hibridação do DNA. O desenvolvimento de técnicas que têm a conveniência de hibridização em fase sólida e são rápidas, sensíveis e facilmente reproduzidas terá um impacto significativo em diagnósticos e genômica²⁹.

1.4 – BIOSENSOR DE DNA

Biossensores são definidos como dispositivos analíticos incorporados a um material biológico (tecidos, microorganismos, organelas, enzimas, ácidos nucleicos, etc.), a um material derivado biologicamente ou integrado com um transdutor, que pode ser óptico, eletroquímico, termométrico, piezoelétrico ou magnético. Eles vêm sendo aplicados a uma grande variedade de problemas analíticos tanto na medicina, quanto no meio ambiente e na alimentação; em processos industriais e em segurança, entre tantos. Vários são os materiais que podem ser incorporados aos sensores. Particularmente os biossensores de DNA são utilizados nos estudos de interação cinética entre compostos biologicamente ativos e DNA, através de técnicas eletroquímicas, tais como voltametria cíclica, técnica de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, entre outras^{30,31,32}.

²⁸ GUTIERREZ, P.L.; NGUYEN, B. In *Electrochemistry in Cancer.*; Dryhurst, G.; Niki, K., Ed.; Plenum Press; New York, **1988**, 369.

²⁹ THORP, H.H. *Trends in Biotechnology*, **1998**, 16, 117.

³⁰ BRETT, A. M. D. et al. *Biosensors and Bioelectronics*, **1998**, 13, 861.

³¹ LA-SCALEA, M. A. et al.; *Química Nova*, **1999**, 22(3), 417.

Biomacromoléculas têm papel importante nos processos básicos da vida. Dentre elas estão os ácidos nucleicos, as proteínas e os polissacarídeos. Estudos relacionados à determinação de suas estruturas, propriedades e interações com outras substâncias, tornou-se essencial para a compreensão de vários processos biológicos. No caso do DNA, a estrutura tri-dimensional de sua dupla hélice, consistindo de duas fitas, cada uma delas formadas por grupos fosfatos, pentoses e bases púricas e pirimídicas ligadas através de ligações de hidrogênio é de fundamental importância (Figura 12).

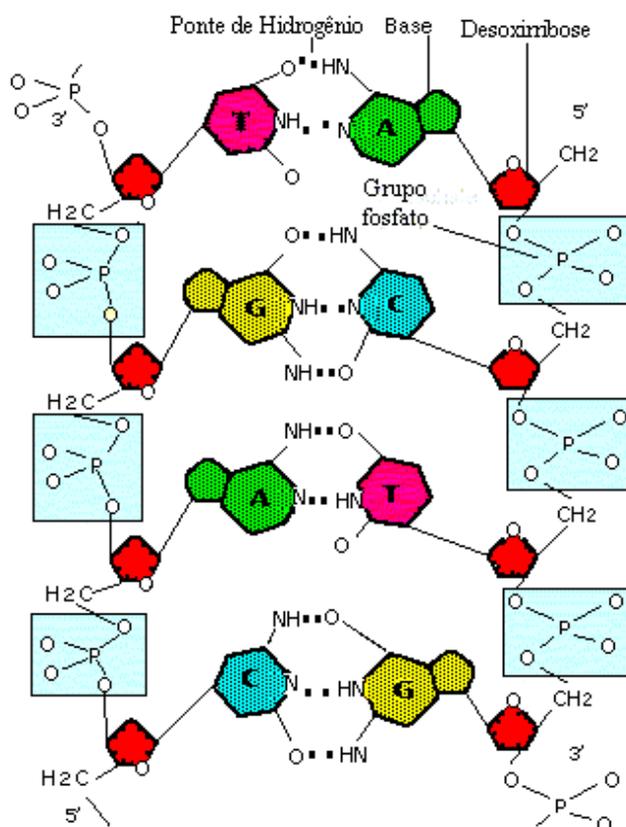


Figura 12. Ligações de hidrogênio entre as nucleobases do DNA em fita dupla.

O DNA é um dos alvos biológicos de maior relevância para a ação de fármacos. A figura 13 mostra a desnaturação de uma molécula de DNA por aquecimento (Figura 13). A interação de fármacos com o DNA é considerada um dos mais importantes aspectos em descoberta de fármacos e em processos de desenvolvimento farmacêutico. São três as possibilidades de interação. A primeira delas ocorre pelo controle dos fatores de transcrição e de polimerases, nos quais os fármacos interagem com proteínas que se ligam ao DNA. O segundo faz-se através

³² BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. N.; *J. Braz. Chem. Soc.*; **1995**, 6, 1, 97.

da ligação com RNA tanto com a dupla hélice do DNA, formando tripla hélice, ou com a fita simples, com a formação de híbridos, que podem interferir com a atividade de transcrição. No último caso, há interação de pequenas moléculas diretamente na estrutura do DNA. Essa modificação covalente do DNA por agentes citotóxicos representa uma lesão bioquímica grave. Nesse caso, as interações podem ser eletrostáticas, geralmente inespecíficas, com o envolvimento do arcabouço negativo (açúcar-fosfato), via intercalação entre os pares de bases ou interação covalente³³.

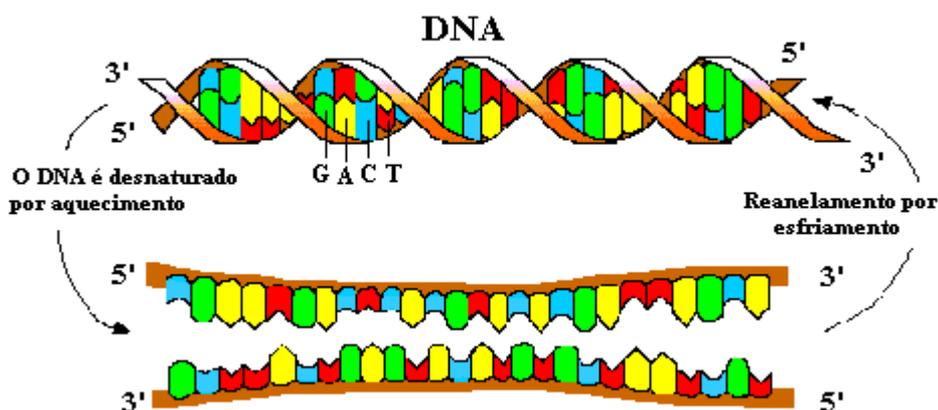


Figura 13. Representação do DNA, em fita dupla e em fita simples, evidenciando suas bases constituintes, guanina (G), adenina (A), citosina (C) e timina (T).

Estudos em biossensores de DNA^{30,33,34,35,36} são, portanto, úteis para auxiliar a esclarecer o mecanismo biológico de ação. A Figura 14 mostra uma possível interação de um analito com DNA. Ela entra entre as fitas do DNA, modifica sua conformação, o que leva à exposição de suas bases, passíveis de oxidação anódica.

³³ RAUF, S., *et al.* *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 205.

³⁴ BRETT, A. M. O., *et al.* *Electroanal.* **1996**, *8*, 992.

³⁵ BRETT, A. M. O., *et al.* *Electroanal.* **1997**, 110.

³⁶ BRETT, A. M. O., *et al.* *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1997**, *42*, 175.

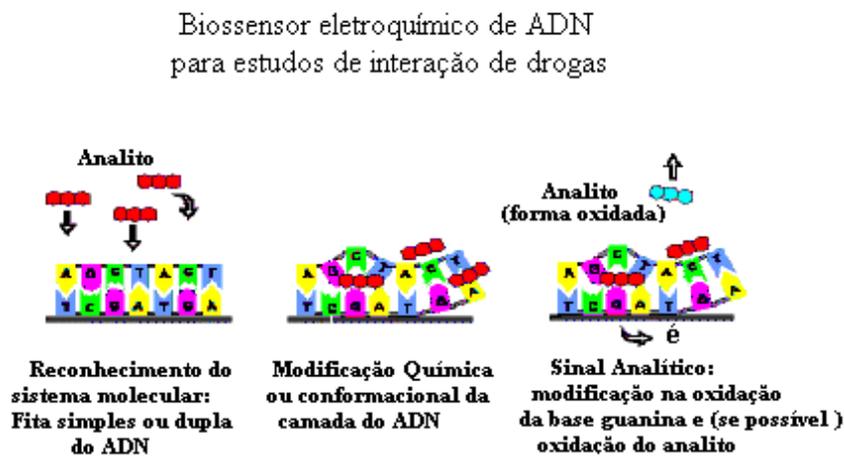


Figura 14. Representação do modo de operação do biossensor de DNA. O analito entra entre as fitas do DNA, modifica sua conformação, o que leva à exposição de suas bases, passíveis de oxidação anódica.

Nos últimos anos, os eletrodos modificados com DNA foram aplicados com sucesso tanto como superfícies modificadas para determinação eletroanalítica de fármacos³⁵, quanto para o estudo da interação dos mesmos com o ácido desoxirribonucléico^{30,33}. Eles permitem avaliar e prever interações com prejuízos celulares, através de experimentos eletroquímicos (voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, em eletrodos de carbono vítreo modificados com DNA em fita dupla e simples) baseados na observação da ligação das moléculas-teste com ácidos nucleicos (Figura 15).

Em eletrodos de carbono vítreo, a eletro-oxidação do DNA, em meio ácido, relaciona-se à oxidação das bases púricas (guanina, adenina), sendo as bases pirimídicas (timina, citosina) eletroinativas nessas condições^{37,38}. De modo geral, os valores de potencial de oxidação (E_{ox} vs. ESC), em pH 7,2, para a poliguanina [poli(G)] e poliadenina [poli(A)], em eletrodo de grafite pirolítico, são +0,89 V e +1,17 V, respectivamente³⁷. Para a 8-oxoguanina, E_{ox} é de +0,45 V³⁰. O dsDNA (DNA nativo, “double-strand” ou fita dupla) sempre apresenta menores correntes de eletrooxidação quando comparado ao ssDNA (DNA desnaturado, “single-strand” ou fita única), desnaturado termicamente, não só pelo fato de os sítios de oxidação

³⁷ BRETT, A. M. O., et al. In “Comprehensive Chemical Kinetics”, Elsevier: Amsterdam, **1999**, cap. 3, 91.

³⁸ DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, P., et al. *Electroanal.* **2004**, 16, 1193-1204.

estarem protegidos (envolvidos em ligações hidrogênio) como também por sua menor flexibilidade e maior dificuldade de adsorção. Isoladamente, pH 7,0 com eletrodo de carbono vítreo e por voltametria de pulso diferencial, as bases guanina e adenina apresentam picos de mesma intensidade; já os picos de oxidação das bases timina e citosina, só podem ser observados em altas concentrações³⁰ (Figura 15).

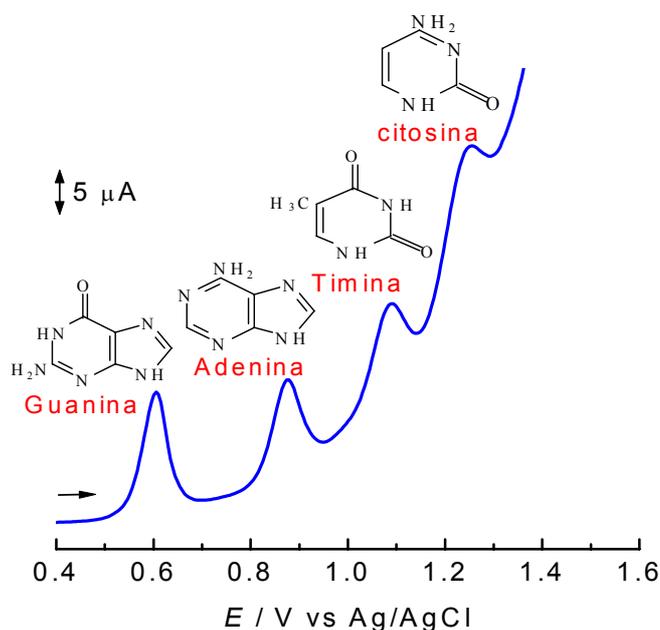


Figura 15. Voltamogramas de pulso diferencial (carbono vítreo) para a mistura das bases guanina, adenina ($2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), timina e citosina ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Tampão fosfato pH 7,4. $v = 5 \text{ mVs}^{-1}$, amplitude 50 mV. Adaptado da referência³⁰.

Há casos em que fica evidente a necessidade da redução preliminar das substâncias para a interação com o DNA. Essa redução pode ser realizada e acompanhada eletroquimicamente *in situ* ou *ex-situ*, com o DNA em solução ou na superfície eletródica, normalmente, em eletrodo de carbono vítreo ou pasta de carvão³⁹. O desenvolvimento de novos métodos capazes de determinar a concentração mínima dos fármacos é importante em formulações farmacêuticas e em líquidos biológicos³³. No caso da interação fármaco anticâncer-DNA, pode-se determinar essa concentração, via eletroquímica. A informação analítica de destaque

³⁹ WANG J., et al.. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, 45, 33.

advém da resposta aumentada do sinal da guanina, associada à interação das drogas em uma superfície de DNA determinada³³, entre outros.

Em muitos exemplos, a interação com o DNA inexistente, evidenciando que esse não é o alvo para a ação biológica. Nesse caso, não há evidência dos picos de oxidação das bases constituintes do DNA, o que indica manutenção da conformação original. Investigações eletroquímicas indicaram que a β -lapachona (**XXI**)^{40,41} (Figura 16A), quinona de ocorrência natural que apresenta várias atividades biológicas, inclusive atividade anticancerígena, não interage com o DNA (Figura 17)⁴¹, o que corrobora experimentos bioquímicos e físicoquímicos anteriormente descritos⁴². Outros mecanismos de ação operam. Um provável mecanismo de interação da β -lapachona (**XXI**) com topoisomerasas, enzimas essenciais para manter o estado topológico apropriado do DNA durante seus processos de replicação, transcrição e recombinação, foi proposto⁴² e novamente, experimentos eletroquímicos mostraram-se úteis para mimetizar interações com topoisomerasas⁴¹. A α -lapachona (**XXII**) (Figura 16B) não apresenta qualquer atividade farmacológica e é utilizada como um padrão de comparação de reatividade e atividade farmacológica.

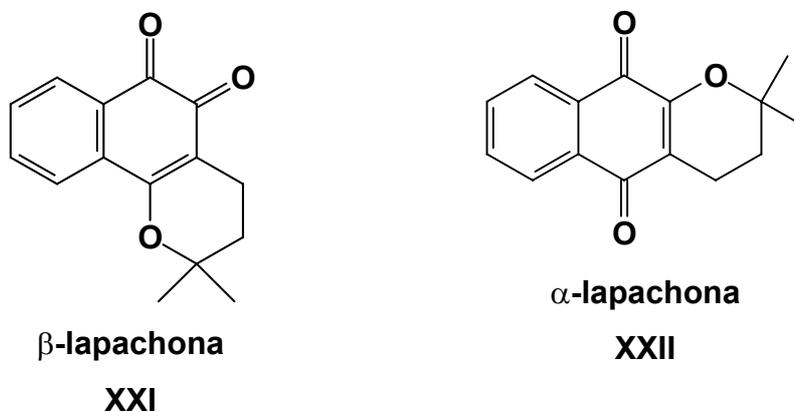


Figura 16. Estrutura química da β -lapachona (XXI) e α -lapachona (XXII).

⁴⁰ DE ABREU, F. C., GOULART, M. O. F., BRETT, A. M. O. *Electroanal.* **2002**, *14*, 29.

⁴¹ BRETT, A. M. O., GOULART, M. O. F.; DE ABREU, F. C. *Bioelectrochem.*, **2002**, *56*, 53.

⁴² NEDER, K., MARTON, L. J., LIU, L. F., FRYDMAN, B. *Cell Mol. Biol.* **1998**, *44*, 465.

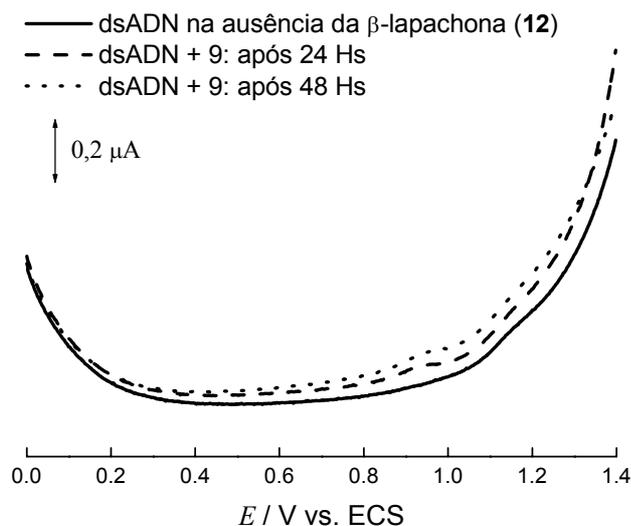


Figura 17. Voltametria de pulso diferencial do biossensor de dsDNA com β -lapachona, $6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de (...dsDNA) e (___ após 24, 30 e 48 h.). Tampão acetato, pH 4,5, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

1.5 – CLASSES DE SUBSTÂNCIAS ELETROBIOATIVAS ESCOLHIDAS

1.5.1 – N-ÓXIDOS

Íons imínio conjugados apresentam inúmeras atividades fisiológicas. Acredita-se que sejam gerados metabolicamente *in vivo*. Sua principal função relaciona-se com processos de transferência de carga: interferência em transferência eletrônica ou geração de espécies oxigenadas reativas. A carga positiva presente facilita a abstração de elétrons a partir de material celular. Entre os compostos diimínicos, encontram-se os di-N-óxidos. Mostrou-se recentemente que 1,4-di-N-óxidos de quinoxalinas são importantes agentes seletivos à hipoxia. Estudos eletroquímicos foram também realizados^{43,44,45}.

A Tirapazamina (**VIII**), composto polifuncionalizado, possui grupos azoxi e N-óxido e é o composto líder dessa classe de drogas anti-cancerígenas seletivas à hipoxia e o primeiro a ser introduzido em clínica médica, exclusivamente, como um

⁴³ RYAN, M. *et al.* *J. Pharmac. Sciences*, **1985**, 74, 492.

⁴⁴ TRACY M, WARDMAN P. *Free Radical Research* **1996**, 25, 393.

⁴⁵ CERECETTO, H. *et al.*; *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 1941.

agente citotóxico biorredutivo⁴⁶. Programas vêm sendo desenvolvidos para preparar derivados mais ativos. Os parâmetros mais importantes no processo de transformação são a afinidade eletrônica, relacionados ao potencial redox, e a solubilidade em água.

O mecanismo de ação da Tirapazamina ainda necessita de esclarecimento, mas, a espécie radicalar originária da redução de um elétron parece estar envolvida, o que causa danos ao DNA, por reação com o radical C-1' do açúcar, levando à geração de desoxiribonolactona, com concomitante quebra do DNA (Figura 18)⁴⁷.

São vários os mecanismos propostos. A figura 18 apresenta o mecanismo atualmente mais aceito⁴⁸. Estudos teóricos foram empregados para investigar os mecanismos propostos experimentalmente. O mecanismo energeticamente favorável, de acordo com aquele obtido experimentalmente, ocorre via ligação direta do oxigênio, O₄, do grupo N-óxido da tirapazamina ao centro radicalar do açúcar. A transferência do oxigênio pode então ser realizada, via homólise da ligação O₄-N₄, com obtenção, após protonação e reação posterior, da desoxiribonolactona (Figura 18).

⁴⁶ DENNY WA, WILSON WR *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2000**, 9, 2889.

⁴⁷ BAN, F.; GAULD, J. W.; BOYD, R.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 732-7325.

⁴⁸ HWANG, J.; GREENBERG, M.M.; FUCHS, T.; GATES K. S. *Biochem.* **1999**, 38, 14248.

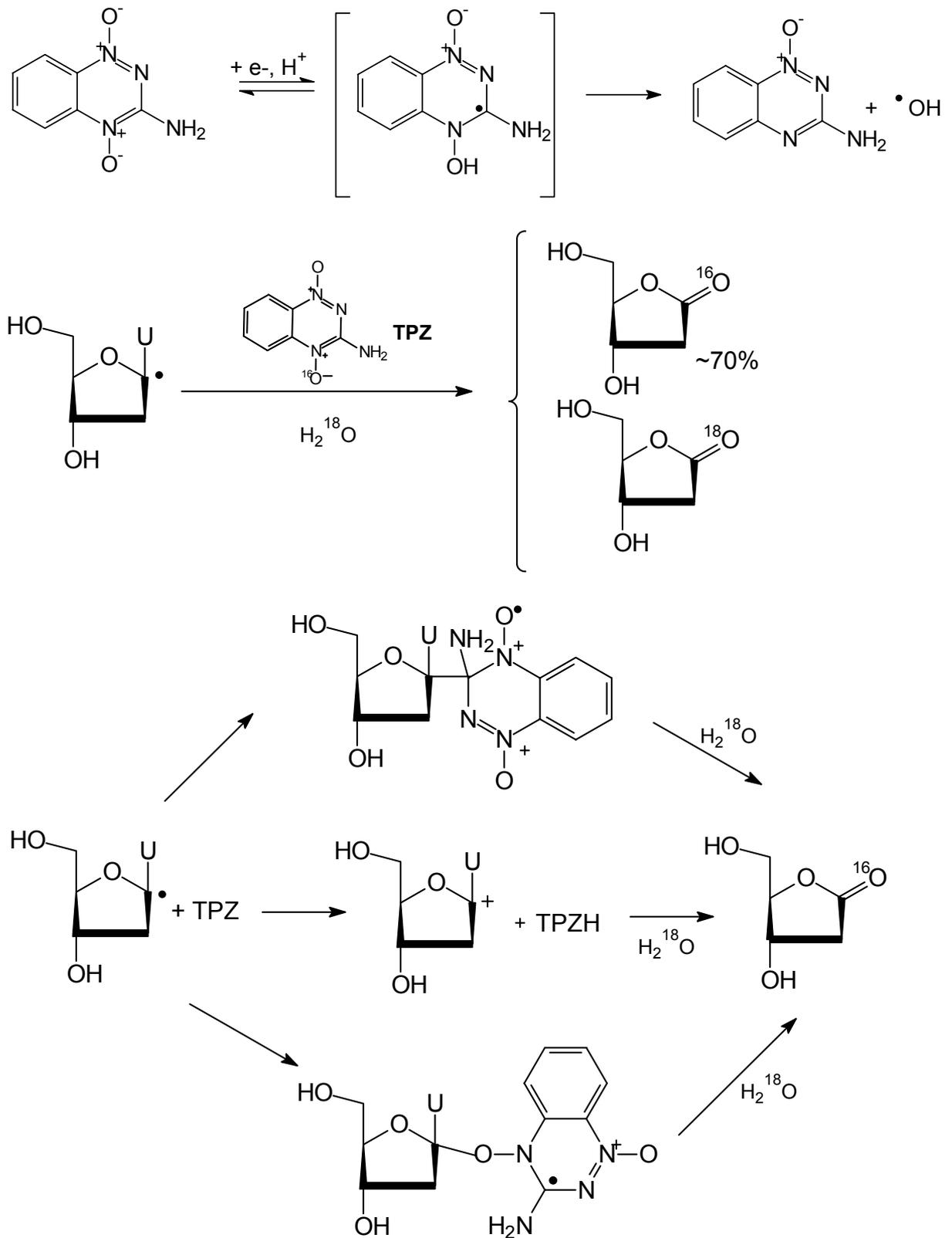
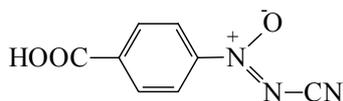


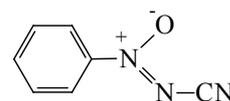
Figura 18. Metabolismo redutivo da tirapazamina (VIII), mediado por redutases.⁴⁷

1.5.2 – ÁCIDO CALVÁTICO E ANÁLOGOS

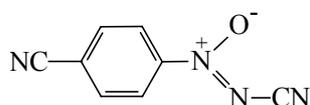
Entre os N-óxidos, destacam-se o ácido calvático (1) e muitos dos seus análogos (2-8), que apresentam o grupo funcional ciano-NNO-azoxi e revelam propriedades bactericidas, fungicidas e antitumorais significativas⁴⁹.



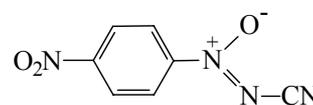
ÁCIDO CALVÁTICO (1)



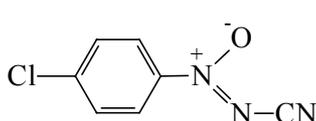
2



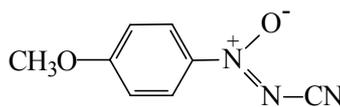
3



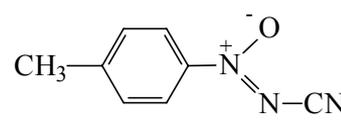
4



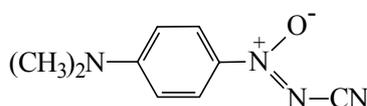
5



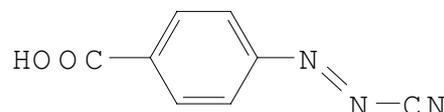
6



7



8



9

O ácido calvático [2-Óxido de 2-(carboxifenil)-diazencarbonitrila] (1) é um antibiótico natural isolado de culturas de alguns Basidiomicetos, no caso de *Calvatia lilacina*⁵⁰. Ele mostrou ação inibitória sobre o crescimento de células tumorais e de culturas microbianas^{51,52,53}. Adicionalmente, mostrou-se apto em reagir rapidamente, em condições fisiológicas, com a cisteína, mas não com serina e lisina⁵⁴. A reatividade da função ciano-NNO-azoxi com resíduos de cisteína é provavelmente

⁴⁹ BOSCHI, D.; *et al. Pharmazie*, **2001**, 56, 670.

⁵⁰ GASCO, A. *et al. Tetrahedron Lett.*, **1974**, 38, 3431.

⁵¹ UMEZAWA, H. *et al.; J. Antibiot.* (Tóquio), **1975**, 28, 87.

⁵² CALVINO, R. *et al.; J. Antibiot.* (Tóquio), **1986**, 39, 864.

⁵³ GADONI, E. *et al.; Biochem. Pharmacol.*, **1989**, 38, 1121.

⁵⁴ GASCO, A. M. *et al.; Med. Chem. Res.*, **1993**, 28, 34.

responsável pela habilidade do ácido calvático em inibir cisteína proteinases e glutiona transferases⁵⁵.

Uma análise detalhada da GST P1-1 (glutona transferase P1-1) com ácido calvático e seu análogo reduzido diazocianida (**9**) foi relatada⁵⁶. O ácido calvático inibe a enzima, porém, o faz muito mais lentamente que seu análogo diazocianida (produto de redução). A inativação da GST P1-1 ocorre por um processo redox que induz ao desaparecimento de quatro grupos tióis na isoenzima dimérica, provavelmente devido à formação da ponte dissulfeto Cys47-Cys101 em cada subunidade⁵⁷ (Figura 19).

O ácido calvático e alguns de seus análogos exibem potente ação contra muitas cepas de *Helicobacter pylori*, inclusive em relação a duas que são resistentes ao metronidazol⁵⁸. Ele foi também usado como fungicida agrícola⁵⁹.

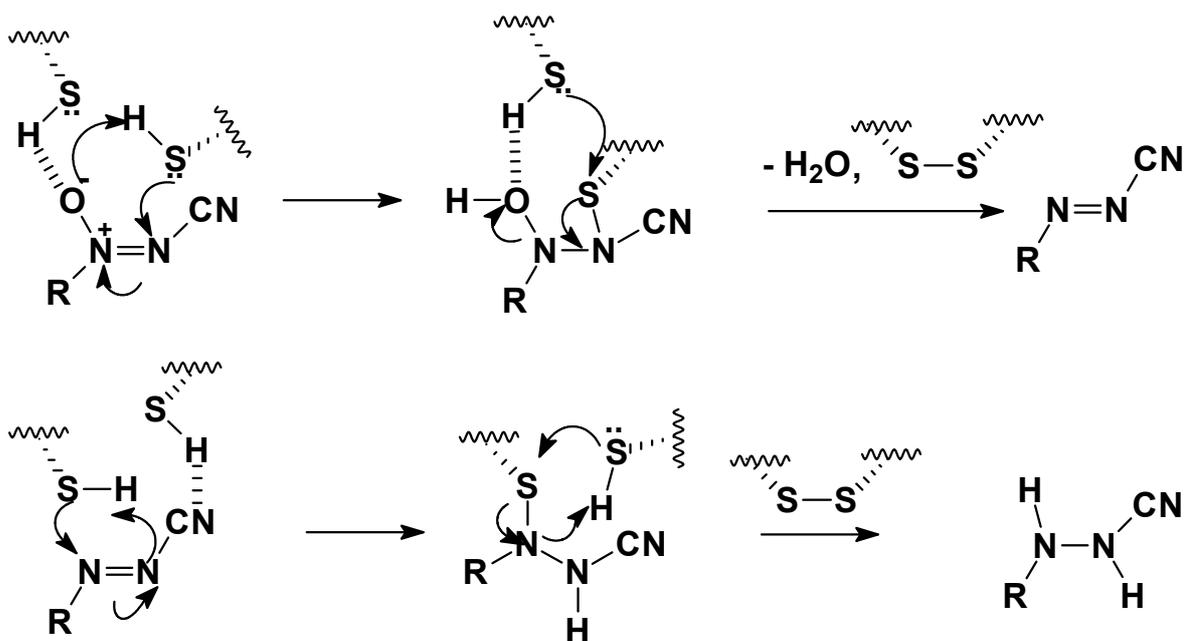


Figura 19. Esquema proposto para a reação do ácido calvático (**1**) com GST P1-1 e L-cisteína (R = p-HOCC₆H₄)⁵⁷.

A química desse grupo funcional, considerado similar aos sais de diazônio, foi pouco explorada^{33,60}. Compostos azo, azoxi e hidrazo podem sofrer redução para

⁵⁵ CACCURI, A. M. *et al.*; *Biochem. Mol. Biol. Enterre*, **1994**, 32, 819.

⁵⁶ ANTONINI, G. *et al.*; *Eur. J. Biochem.* **1997**, 245, 663.

⁵⁷ CACCURI, A. M.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, 1122, 265.

⁵⁸ BOSCHI, D. *et al.*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 403.

⁵⁹ WOOD WW, *et al.*; *Abstracts of Papers of The American Chemical Society* **1997**, 214, 144.

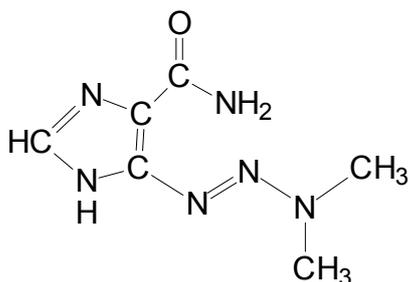
⁶⁰ MORTARINI, V. *et al.*; *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Therapeutica* **1977**, 12, 59.

aminas⁶¹. Metais e ácidos são freqüentemente usados como agentes redutores. Azobenzenos são reduzidos, em um processo com captura de quatro elétrons, a hidrazobenzenos e são, geralmente, mais difíceis de reduzir que os azobenzenos; isso é similar ao que ocorre com o sistema nitro-nitrosobenzeno.

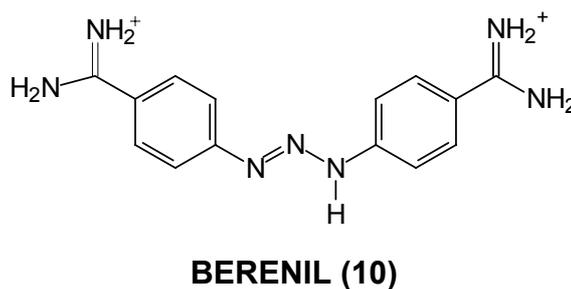
1.5.3 –TRIAZENOS

Os triazenos⁶² são compostos orgânicos caracterizados pelo grupo (N=N-NH). A química dos triazenos data de 1859, quando Griess sintetizou o primeiro triazeno, 1,3-bis(fenil)triazeno. A descrição compreensiva desta molécula foi relatada por F.A. Benson no livro *The High Nitrogen Compounds* em 1984⁵⁵. Moléculas de triazenos tornaram-se fontes de diversas pesquisas científicas, devido ao grau de aplicações em várias áreas do conhecimento, inclusive na medicina para o combate ao câncer. As propriedades estruturais de ânions triazênicos são formalmente análogos ao anion nitrito, O=N-O-.

Embora inicialmente considerado como antimetabólito, sabe-se, atualmente, que o derivado triazeno Dacarbazina (DTIC) (**XXIII**), atua através do processo de alquilação do DNA. A Dacarbazina (**XXIII**), para ter eficiência quimioterápica, exige ativação inicial pelo sistema do citocromo P-450 do fígado através de uma reação de N-desmetilação. Na célula alvo, ocorre então uma clivagem espontânea do metabólito liberando um componente alquilante, o diazometano⁶³ (Figura 20).



DACARBAZINA
XXIII



BERENIL (10)

⁶¹ NEWBOLD, in Patai, *The Chemistry of the Hydrazo, Azo and Azoxy Groups*, Wiley: New York, **1975**, part 2, pp 602-603, 614-624.

⁶² MOORE, D.S. & ROBINSON, S.D.; *Adv. Inorg. Chem. Radiochem*, **1986**, 30, 1-68.

⁶³ GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, **1995**, p. 903-949.

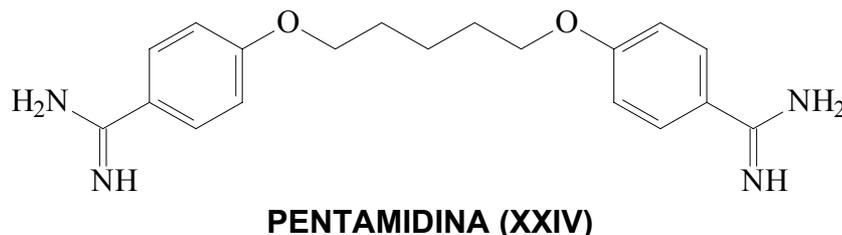


Figura 20. Triazenos biologicamente ativos

A pentamidina (**XXIV**) e derivados bis-benzamidínicos têm sido utilizados como medicamentos alternativos no tratamento da leishmaniose, tripanossomíase africana⁶⁴ e infecções oportunistas em pacientes com AIDS⁶⁵. Estas substâncias apresentam, como desfavoráveis ao seu uso, o tratamento prolongado e a possibilidade de apresentarem efeitos colaterais. A pentamidina (**XXIV**) e seus análogos têm um expressivo efeito sobre o sistema de coagulação sanguínea através da inibição da trombina⁶⁶ e sobre a produção de plaquetas. O berenil (4,4'-diazamino-bis-benzamidina) (**10**), em compensação, é um inibidor competitivo parabólico da trombina. Através da técnica de otimização estrutural para a minimização de energia, obtêm-se parâmetros que mostram o efeito da droga sobre a trombina e sobre uma seqüência definida do DNA.

1.5.4 –BERENIL (**10**)

O Berenil (**10**) é uma diamidina aromática simétrica que vem sendo muito utilizado em tratamentos veterinários como um agente tripanossomicida e leishmanicida, contra *Trypanosoma* e *Leishmania*. O Berenil veio a ser o produto mais comumente usado nas tripanossomoses dos animais domésticos devido a um número de fatores: apresenta o mais alto índice terapêutico em relação às outras drogas para a maioria das espécies domésticas; atividade contra tripanossomas que são resistentes a outros tripanocidas usados em bovinos, apresenta uma baixa incidência de resistência⁶⁷.

Com base no modelo molecular do complexo DNA – Berenil, sabe-se hoje por estudos biofísicos que a interação destas moléculas dá-se na fenda menor do DNA, e essa interação é realizada pelas ligações de hidrogênio que são estabelecidas

⁶⁴ WILLIAMSON, J. *Exp. Parasitol.*, **1970**, 12, 274.

⁶⁵ ABRAMOWICZ, M. – *Med. Lett. Drugs Ther.*, **1979**, 21, 105.

⁶⁶ VIEIRA, L. M.; *et al.* – *Rev. Bras. Anal. Clín.*, **1992**, 24, 43.

⁶⁷ PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M.. *Acta Tropica*, Basel, **1993**, v.54, p.185-203,.

entre resíduos de adenina e timina do DNA e o berenil (**10**) (Figura 21), que interferiria em um processo fundamental como o de transcrição e replicação.^{68,69}

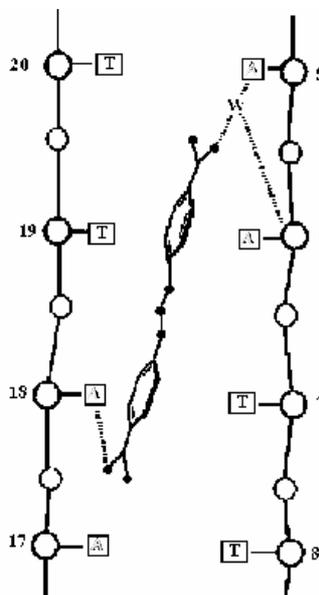


Figura 21. Interação do berenil com as nucleobases.⁶⁸

1.5.5 –MOSTARDAS

Durante a Primeira Guerra Mundial, a atenção médica focalizou-se, inicialmente, na ação vesicante da mostarda de enxofre sobre a pele, os olhos e as vias respiratórias. Mais tarde, no entanto, percebeu-se a ocorrência de uma grave intoxicação sistêmica após a exposição à substância. No intervalo entre a Primeira e a Segunda Guerras Mundiais, efetuaram-se estudos extensos sobre as ações biológicas e químicas das mostardas nitrogenadas e uma pronunciada ação citotóxica sobre o tecido linfóide levou Gilman, Goodman e T. F. Dougherty a estudarem os efeitos das mostardas nitrogenadas sobre o linfossarcoma transplantado em camundongos e, em 1942, foram iniciados estudos clínicos, inaugurando com isso a era da moderna quimioterapia do câncer⁶³.

As substâncias alquilantes quimioterápicas têm em comum a propriedade de se transformarem em fortes eletrófilos através da formação de intermediários carregados positivamente ou de complexos de transição com as moléculas-alvo. Essas reações resultam da formação de ligações covalentes por alquilação de vários componentes eletrófilos, como fosfato, amino, sulfidila, hidroxila, carboxila e grupos

⁶⁸ BARCELÓ, F.; ORTIZ-LOMBARDIA, M.; PORTUGAL, J.; *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1519, 175.

⁶⁹ PORTUGAL, J.; WARING, M. J.; *Eur. J. Biochem.* **1987**, 167, 281.

imidazólicos. Os efeitos quimioterápicos e citotóxicos estão diretamente relacionados à alquilação do DNA. O átomo de nitrogênio 7 da guanina é particularmente susceptível à formação de uma ligação covalente com substâncias alquilantes monofuncionais e bifuncionais e pode representar muito bem o alvo principal que determina os efeitos biológicos dessas drogas. Entretanto, é preciso considerar que outros átomos nas bases púricas e pirimídicas do DNA – por exemplo, os nitrogênios 1 e 3 da adenina, o nitrogênio 3 da citosina e o oxigênio 6 da guanina – também podem ser alquilados em menor grau, bem como os átomos de fosfato das cadeias de DNA e as proteínas associadas ao DNA⁶³.

Para ilustrar as ações das substâncias alquilantes, a Figura 22 mostra as possíveis conseqüências da reação da mecloretamina (mostarda nitrogenada) (11) com resíduos de guanina na cadeia de DNA. Em primeiro lugar, uma cadeia lateral 2-cloroetila sofre ciclização intramolecular de primeira ordem (SN_1), com liberação de Cl^- e formação de um intermediário etilenimínio reativo. Através dessa reação, a amina terciária é convertida em composto de amônio quaternário. O etilenimínio intermediário pode reagir avidamente, através da formação de um íon carbônico ou de um complexo intermediário de transição, com grande número de íons inorgânicos e moléculas orgânicas por meio de reações que se assemelham a uma reação de substituição nucleofílica de segunda ordem (SN_2). A alquilação do nitrogênio 7 dos resíduos de guanina no DNA, que é uma reação altamente favorecida, pode exercer diversos efeitos de considerável importância biológica, como ilustra a Figura 23. Normalmente, os resíduos de guanina no DNA existem predominantemente na forma do tautômero ceto e formam imediatamente pares de bases tipo Watson-Crick por ligações de hidrogênio com resíduos de citosina. Todavia, quando o nitrogênio 7 da guanina sofre alquilação (transformando-se em nitrogênio de amônio quaternário), o resíduo de guanina é mais ácido e o tautômero enol é favorecido.

A guanina modificada pode formar pares de bases com os resíduos de timina, levando assim a uma possível codificação errônea e à substituição final de um par de bases de adenina-timina por guanina-citosina. Em segundo lugar, a alquilação do nitrogênio 7 enfraquece o anel imidazol, tornando possível a sua abertura ou a sua despurinação, por excisão dos resíduos de guanina. Qualquer dessas reações pode provocar grave lesão da molécula de DNA. Em terceiro lugar, no caso de substâncias alquilantes bifuncionais, como a mostarda nitrogenada, a segunda cadeia lateral 2-cloroetila pode sofrer ciclização semelhante e alquilar o resíduo de

guanina ou outra fração nucleofílica, como um grupo amino ou um radical sulfidríla de uma proteína. Esse processo pode resultar na ligação cruzada de duas cadeias de ácidos nucleicos ou na ligação de um ácido nucleico a uma proteína por ligações covalentes (Figura 22). Tais alterações causariam grave prejuízo ao funcionamento do ácido nucleico. Qualquer desses defeitos pode explicar adequadamente tanto os efeitos mutagênicos quanto os efeitos citotóxicos dos fármacos alquilantes⁶³.

1.5.6 – MECLORETAMINA

A mostarda nitrogenada, **mecloretamina**, pode ser considerada o agente antitumoral mais antigo e mais extensivamente empregado em clínica ainda em uso⁷⁰. Seu alto grau de citotoxicidade é atribuído à sua habilidade em produzir cruzamentos interfilamentares em DNA⁷¹. Apesar dos inúmeros estudos realizados, o interesse na área permanece intenso e crescente. Uma vez que mostardas sulfuradas e nitrogenadas podem reagir com o DNA, torna-se interessante analisar essas possíveis interações com o uso de dispositivos sensíveis e facilmente preparáveis, como por exemplo, o biossensor eletroquímico de dsDNA.

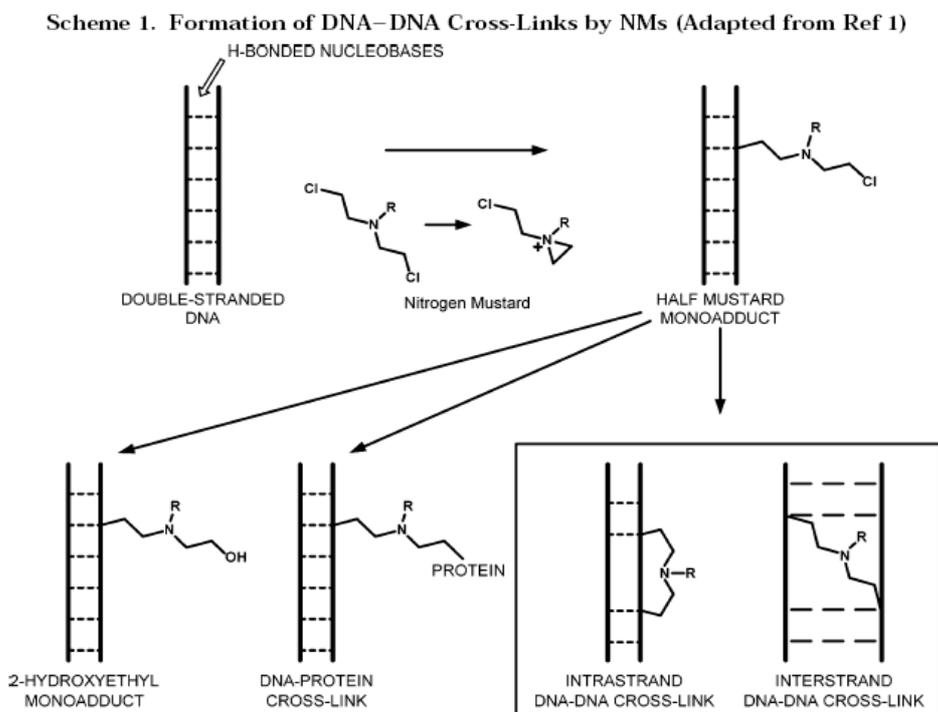


Figura 22. Formação de ligações cruzada DNA-DNA.⁷²

⁷⁰ GILMAN, A.; PHILLIPS, F. S. *Science* **1946**, 103, 409.

⁷¹ RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M.; *Chem Rev.* **1998**, 98, 2723.

⁷² BALCOME, S.; PARK, S.; DORR, D. R. Q.; HAFNER, L.; PHILLIPS, L.; TRETYAKOVA, N. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, 17, 950-962.

Um grande problema relacionado às mostardas nitrogenadas clássicas é a falta de seletividade, o que causa dano inadvertido ao DNA, em células normais, efeitos mutagênicos e tóxicos, que podem levar, em alguns casos, à cânceres secundários. Há pesquisa intensa e recente no desenvolvimento de agentes alquilantes mais seletivos. Esse desenvolvimento se beneficia de um melhor entendimento de alvos moleculares e mecanismos de citotoxicidade e mutagenicidade de mostardas nitrogenadas⁷².

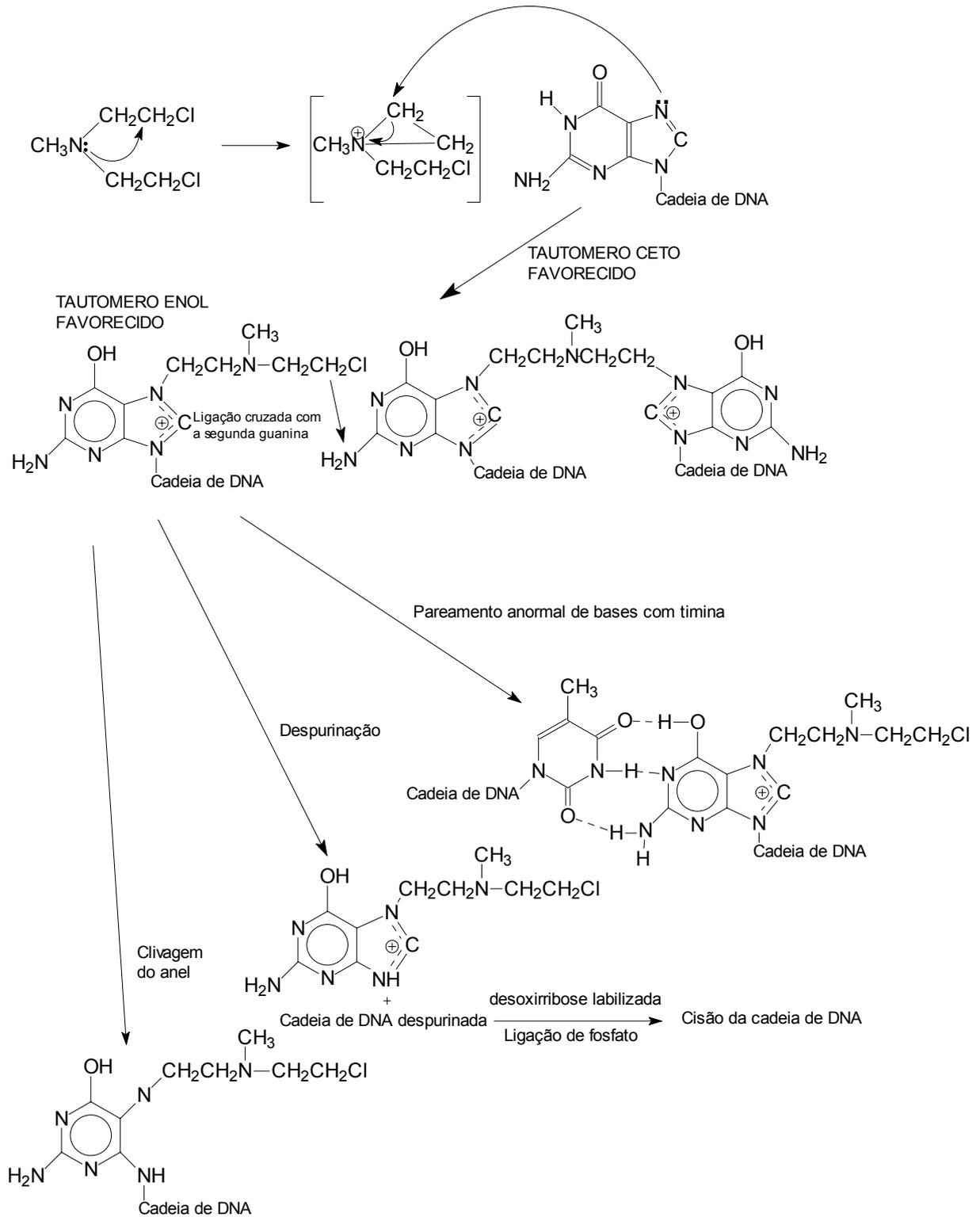


Figura 23. Mecanismo de ação dos compostos alquilantes⁶³.

2. OBJETIVOS

2. 1. OBJETIVOS GERAIS

- Investigar o comportamento eletroquímico do Ácido Calvático e de seus análogos substituídos (Figura 24), com esclarecimento sobre os mecanismos eletródicos.
- Aplicar biossensores de dsDNA, com o uso de voltametria de pulso diferencial, para investigar a possível interação de compostos que possuem atividade biológica, como o ácido calvático (**1**), o **berenil** e a **mecloretamina** (Figura 24).

2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a correlação entre os parâmetros eletroquímicos, potenciais de redução em meios prótico e aprótico, e as constantes (σ/σ^-) de Hammett dos substituintes. Eventualmente, se uma correlação for evidenciada, potenciais redox podem ser previstos, o que estende o limite das medidas experimentais com previsão de potenciais redox de uma variedade muito maior de compostos.
- Realizar estudos eletroanalíticos para a quantificação de ácido calvático (**1**) e análogos.
- Verificar o efeito do Ph sobre o comportamento eletroquímico do ácido calvático (**1**) e do seu similar **2**.
- Verificar a possibilidade do biossensor ser utilizado como dispositivo analítico para investigar novos fármacos potenciais que tivessem como alvo o DNA, como na quimioterapia do câncer.

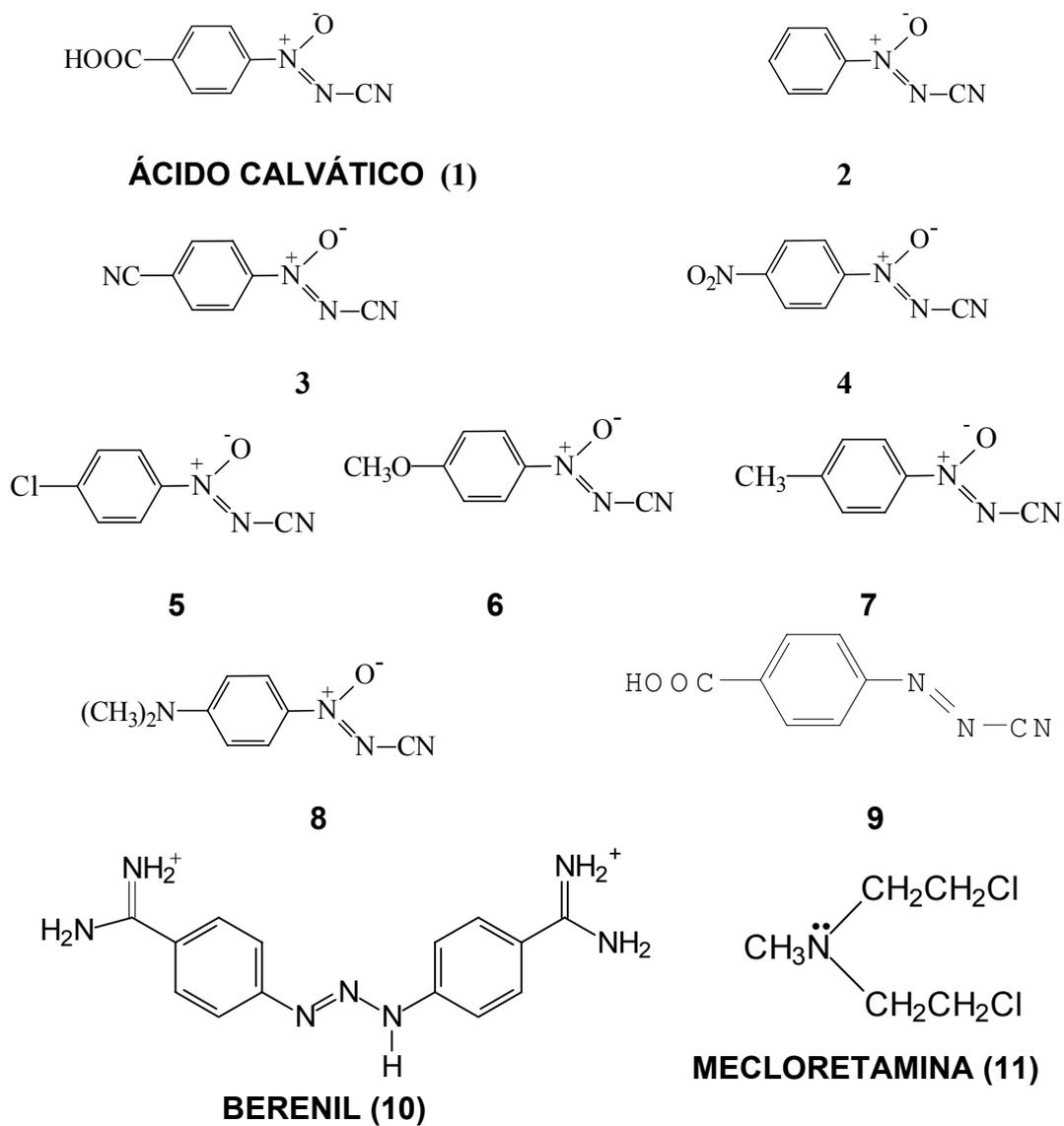


Figura 24. Estruturas químicas dos compostos estudados.

3. METODOLOGIA

3.1 – TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS

Uma célula eletroquímica consiste de dois condutores elétricos chamados eletrodos, imersos em soluções apropriadas de eletrólitos. Uma diferença de potencial elétrico, chamada potencial de célula, pode ser medida entre os eletrodos. Ela é uma medida da energia disponível para direcionar o transporte de carga entre os eletrodos. A magnitude da diferença de potencial na interface eletrodo/solução afeta a energia relativa dos transportadores de carga (elétrons ou íons) nas duas fases, portanto ela controla a direção e a velocidade da transferência de carga. Sendo assim, a medida e o controle do potencial de célula é um dos mais importantes aspectos da eletroquímica experimental. Os dois eletrodos são denominados *cátodo* e *ânodo* de acordo com a reação eletroquímica que ocorre em cada um, *redução* ou *oxidação*, respectivamente. Muitas vezes, apenas uma dessas reações é de interesse e o eletrodo em que ela ocorre é chamado eletrodo de trabalho. Nesse caso, faz-se uso de um terceiro eletrodo, chamado eletrodo de referência, o qual tem essencialmente composição constante e seu potencial é fixo. Portanto, qualquer mudança na célula será atribuída ao eletrodo de trabalho. O potencial do eletrodo de trabalho é observado e controlado com relação ao eletrodo de referência. Nessa célula (de três eletrodos, ver figura 25), uma diferença de potencial é aplicada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência e a corrente passa entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo (ou eletrodo auxiliar), este pode ser de vários materiais, desde que suas propriedades eletroquímicas não afetem o comportamento do eletrodo de interesse e que tenha uma área superficial suficiente para a passagem de toda a corrente da célula⁴.

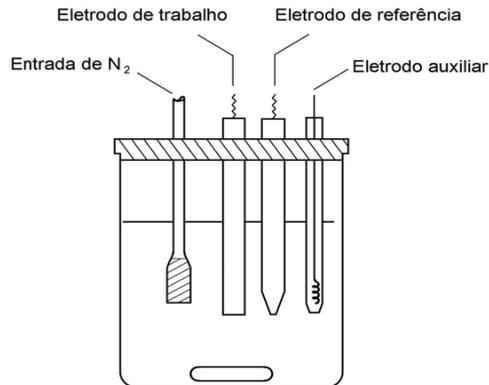


Figura 25. Célula polarográfica/voltamétrica de três eletrodos.

3.1.1 – VOLTAMETRIA CÍCLICA

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroquímica muito utilizada, capaz de fornecer, rapidamente, informações mecanísticas eletródicas. É uma técnica de varredura reversa de potencial, onde o potencial aplicado ao eletrodo é variado numa velocidade conhecida, e ao atingir o potencial final desejado, a varredura é revertida ao valor inicial, na mesma velocidade. Obtém-se, como resposta a essa perturbação, por exemplo, um par de picos, catódico e anódico (Figura 26).

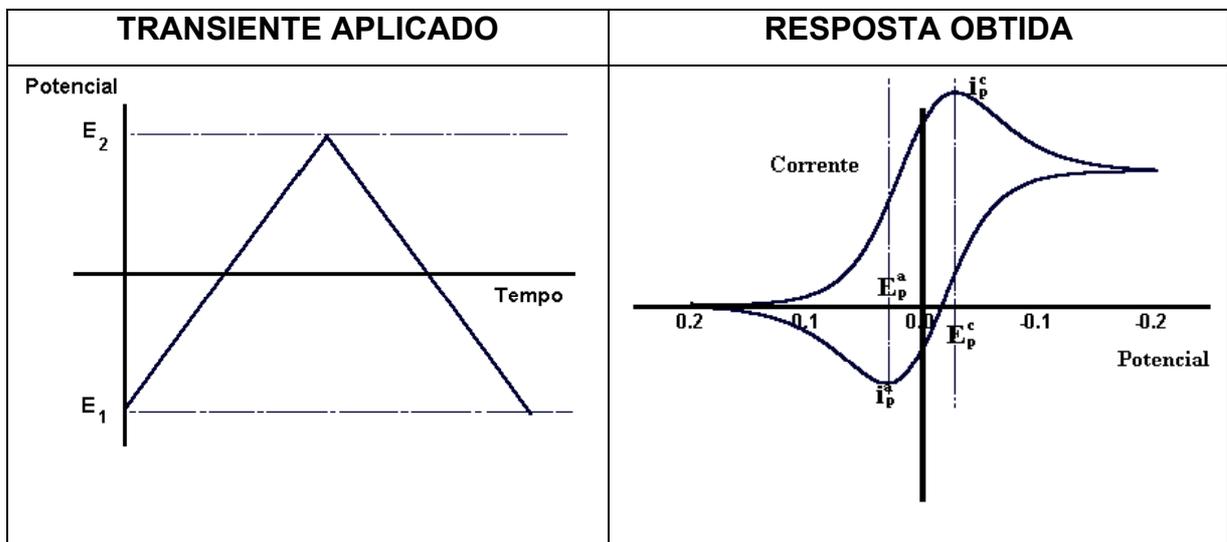


Figura 26. Técnica da VC. Perturbação aplicada e resposta obtida.

De posse dos parâmetros eletroquímicos mais importantes, ou seja, os potenciais de pico catódico e anódico (E_{p_c} e E_{p_a}), as correntes de pico catódico e

anódico (i_{p_c} e i_{p_a}) e os potenciais de meia onda ($E_{1/2}$) ou de pico à meia-altura ($E_{p_{1/2}}$), pode-se analisar o processo eletródico ocorrido.

3.1.2 – VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (VPD)

Uma melhoria instrumental considerável na discriminação da corrente faradaica da capacitiva viria a ser conquistada com o desenvolvimento das técnicas de pulso, principalmente a de pulso diferencial. Neste caso a instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial sejam realizados em intervalos de tempo muito pequenos.

Em voltametria de pulso normal (VPN), escolhe-se um valor base de potencial, E_{base} , normalmente onde não há reação faradaica, e aplica-se ao eletrodo. A partir desse valor aplicam-se pequenos pulsos de amplitude crescente, sendo o aumento de amplitude sempre igual. A corrente é medida no fim de cada pulso, cuja duração varia normalmente entre 5 e 100 ms; o intervalo entre os pulsos é de 2-4 s. A voltametria de pulso diferencial (VPD) é semelhante à VPN, mas com algumas diferenças importantes¹:

- O potencial-base é aumentado entre os pulsos, sendo esses aumentos iguais.
 - A corrente é medida imediatamente antes da aplicação do pulso e no fim do pulso: registra-se a diferença entre as duas correntes.
 - A duração de cada pulso varia normalmente entre 5 e 50 ms.
 - O intervalo entre os pulsos é de 0,5-4 s.
- A curva corrente-potencial está representada na Figura 27.

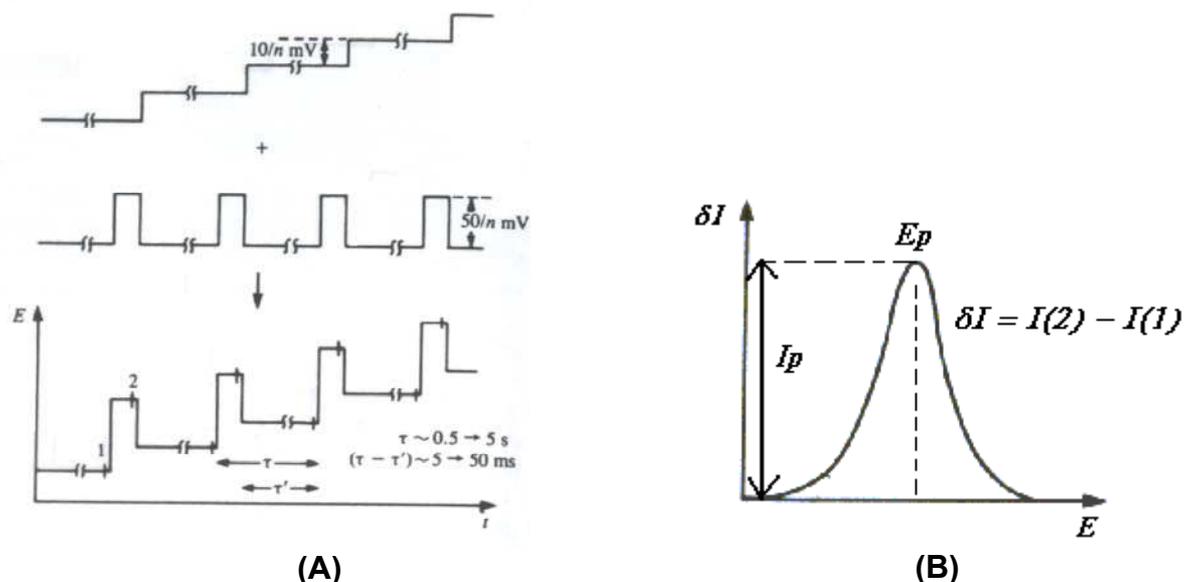


Figura 27. Voltametria de Pulso Diferencial. (A) Esquema de aplicação de potenciais (algumas vezes sobrepostos numa rampa, em vez de numa escada); (B) Perfil corrente-potencial esquemático¹.

Dessa maneira, a corrente capacitiva é compensada, pois os seus valores nos dois pontos onde a corrente é amostrada são muito próximos. Os valores das duas correntes estão separados de dois valores de potenciais por cerca de 50 a 100 mV (que na verdade é o valor da amplitude do pulso superposto).

A diferença de correntes amostradas em (I_1) e em (I_2) será maior ao redor do potencial de meia onda, onde uma pequena variação de potencial produzirá uma grande variação de corrente. A diferença dessas correntes aumentará até atingir um valor máximo próximo do valor de potencial correspondente ao potencial de meia onda ($E_{1/2}$) da polarografia clássica. Após este ponto a diferença dos valores de corrente diminuirá, voltando ao valor da corrente de fundo e o polarograma terá uma forma de pico conforme pode ser visto na Figura 27B.

Conforme está mostrado na Figura 27B, o potencial correspondente ao ponto máximo do pico é chamado de potencial de pico, E_p , e serve para identificar a espécie eletroativa. O valor da corrente correspondente ao E_p é chamado de corrente de pico, I_p , que é proporcional à concentração da espécie eletroativa, permitindo a sua determinação quantitativa. Em razão da corrente capacitiva ser compensada ao registrar-se as diferenças de corrente, a detectabilidade da técnica de pulso diferencial (DP) ultrapassa significativamente à da polarografia clássica ou DC, atingindo-se limites de detecção da ordem de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹. A resolução da

técnica também é melhorada. Na polarografia DC para determinar-se duas substâncias eletroativas simultaneamente elas precisam apresentar uma diferença de potenciais de meia onda de pelo menos 200 mV. Já na polarografia de pulso diferencial uma diferença entre os potenciais de pico (E_p) de apenas 50 a 100 mV poderá ser suficiente para a determinação simultânea.

3.1.3 – VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA (VOQ)

A polarografia/voltametria de pulso diferencial ainda é a técnica mais usada atualmente para fins analíticos, devido às vantagens apresentadas em relação à detectabilidade e à resolução frente as técnicas de corrente contínua. Mas, ao lado dela, uma técnica muito conveniente do ponto de vista analítico que tem sido incorporada em diversos instrumentos comerciais é a voltametria de onda quadrada. A voltametria de onda quadrada foi inventada em 1952 por Barker, mas a utilização da técnica era limitada pela tecnologia eletrônica. Com os progressos na instrumentação, tornou-se uma técnica analítica importante¹.

Os experimentos realizados por VOQ são mais rápidos do que usando-se a técnica de pulso diferencial, com sensibilidade semelhante ou um pouco melhor, pois aqui também ocorrem compensações da corrente capacitiva.

A programação de potencial usada na voltametria de onda quadrada pode ser vista na Figura 28A. Uma onda quadrada simétrica (Figura 28A(b)) é superposta sobre uma rampa de potencial em forma de degraus (Figura 28A(a)) de tal forma que o pulso direto da onda quadrada coincida com o início do degrau da rampa (Figura 28A(c)). O pulso reverso da onda quadrada por sua vez coincide com a metade da etapa da rampa em degraus. Os parâmetros tempo e potencial aplicado são mostrados na Figura 28B, onde τ é o tempo de um ciclo de onda quadrada e também de um ciclo da rampa em degraus. A frequência da onda quadrada em Hz é $1/\tau$. E_{sw} é a amplitude do pulso de onda quadrada em mV, onde $2 \times E_{sw}$ é a amplitude pico a pico (amplitude do pico direto ao reverso). E_{etapa} é o potencial da etapa da rampa de potencial em degraus. A velocidade de varredura v para um experimento de voltametria de onda quadrada pode ser calculada pela equação:

$$v = E_{etapa} / \tau \quad (\text{mV} / \text{s})$$

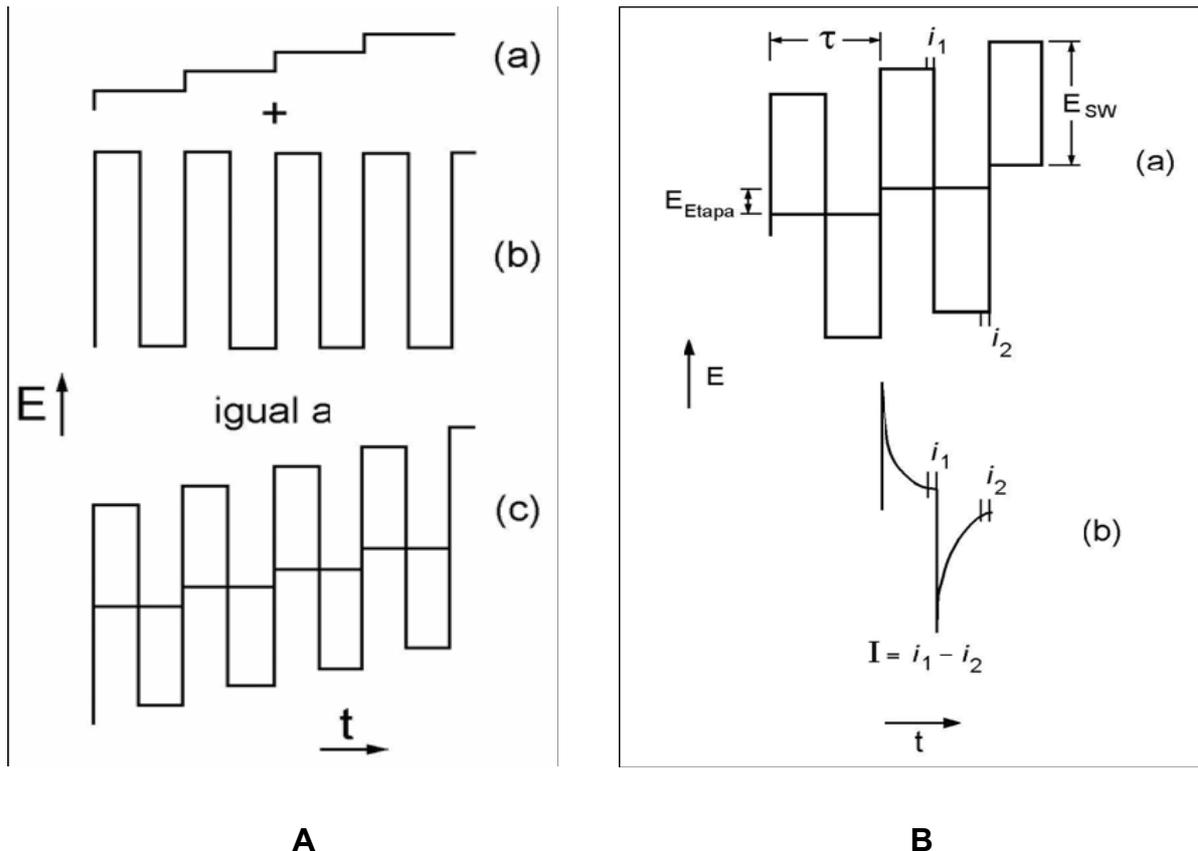


Figura 28. A: Seqüência potencial vs. tempo (E vs. t) usada em voltametria de onda quadrada. **B:** Parâmetros tempo e potencial aplicado em voltametria de onda quadrada, onde: τ = tempo de um ciclo de onda quadrada; $1/\tau$ = freqüência da onda quadrada em Hz; E_{sw} = amplitude de pulso da onda quadrada em mV; E_{etapa} = potencial em mV da etapa de rampa de potencial em degraus e $2E_{sw}$ é a amplitude de pico a pico da onda quadrada em mV.

A forma da onda está representada na figura 29, para sistemas reversíveis(29A) e irreversíveis (29B). Enquanto a DPV funciona com velocidades de varredura entre 1 e 10 mV s^{-1} , a VOQ pode alcançar 1 V s^{-1} .

A medida de corrente na voltametria de onda quadrada é feita amostrando-se a mesma duas vezes durante cada ciclo da onda quadrada, uma vez no final do pulso direto e a outra no final do pulso reverso. A técnica discrimina a corrente capacitiva em razão de sua diminuição mais rápida do que a corrente faradaica, e fazendo-se a amostragem da corrente perto do final da duração do pulso, como no caso da técnica de pulso diferencial. A diferença da corrente entre as duas amostragens é registrada em função do potencial da rampa em degraus. De modo semelhante à técnica de pulso diferencial, a voltametria de onda quadrada produz picos para processos faradaicos, cuja altura é proporcional à concentração da espécie eletroativa.

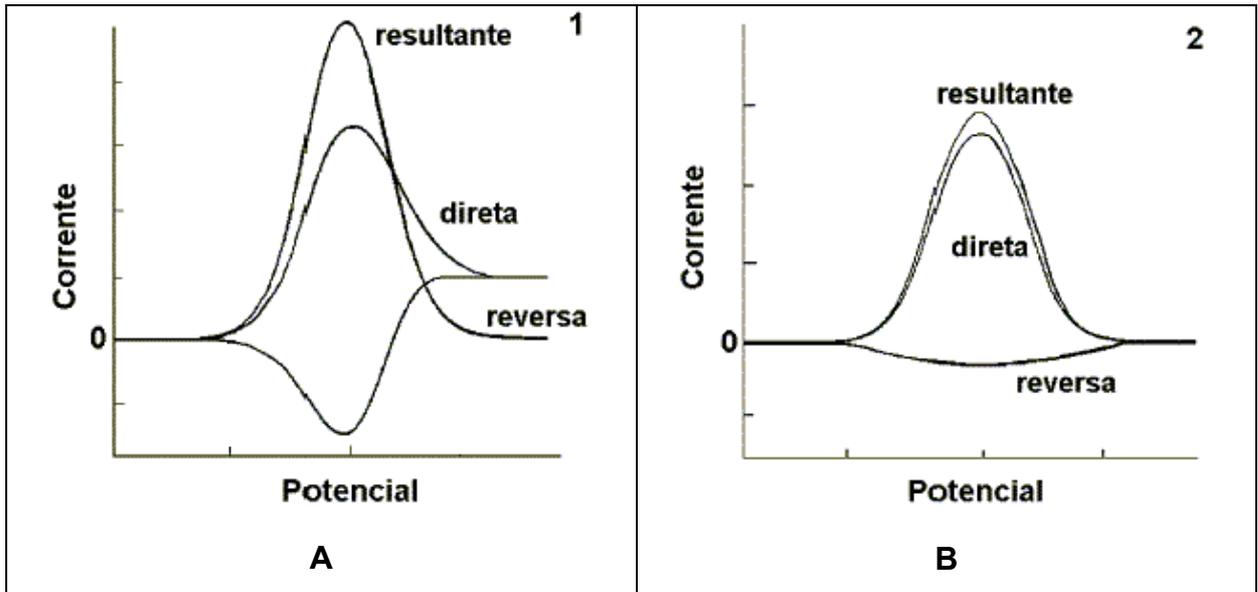


Figura 29. Voltametria de Onda Quadrada (VOQ), perfil corrente-potencial esquemático. (A) Sistema reversível. (B) Sistema irreversível.

3.1.4 – ELETRÓLISE E COULOMETRIA

Além de permitir a transformação de quantidades isoláveis, eletrólises são também utilizadas para auxiliar nas definições mecanísticas. É uma técnica exaustiva que pode ser classificada de acordo com o parâmetro controlado (corrente ou potencial). O potencial aplicado ao eletrodo de trabalho pode ser constante em relação ao eletrodo de referência, ou a corrente é que pode ser mantida constante ao longo do processo. Há processos em que se utiliza um separador para prevenir que os produtos obtidos no contra-eletrodo interfiram na reação (cela dividida) e outros em que esses produtos podem permanecer no meio sem a presença do separador (cela não dividida).

Em coulometria, determina-se a carga total do processo. Pode-se, assim, calcular através das leis de Faraday, a quantidade de material eletrolisado ou o número de elétrons n envolvido na reação (a quantidade de substrato eletrolisado é proporcional à quantidade de carga transferida).

Na coulometria a potencial controlado, registra-se o número de coulombs gasto, o valor da corrente residual e o tempo do processo. Segundo Faraday para a transferência de um mol de elétrons, em uma reação química, são requeridos 96487

coulombs de eletricidade. Partindo-se do princípio que a reação ocorra com 100 % de eficiência, a carga envolvida no processo é dada pela expressão:

$$Q = m \cdot 96487 \cdot n / M$$

Onde m é a massa eletrolisada, n é o número de elétrons envolvido no processo e M a massa molar da espécie eletroativa.

Métodos coulométricos de potencial controlado têm sido aplicados na determinação de vários elementos em compostos inorgânicos. Também oferece possibilidades para determinação eletrolítica (e síntese) de compostos orgânicos.

A análise dos produtos de eletrólise dá importantes subsídios para a determinação do mecanismo de reação⁷³.

⁷³ NIYAZYMBETOV, M. E.; EVANS, D. H. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 9627.

4. EXPERIMENTAL

4.1 – REAGENTES E SOLVENTES

O ácido calvático [2-óxido de 2-(4-carboxifenil)diazeno-carbonitrila] (**1**) e os outros azoxicompostos (**2-8**) foram cedidos pela Profa. Dra. Roberta Fruttero (Faculdade de Farmácia de Turim, Itália). O berenil e a mecloretamina foram obtidos comercialmente.

Nos estudos em meio aprótico foi utilizado como solvente o N,N-Dimetilformamida (DMF) que é um solvente polar com alta constante dielétrica ($\epsilon = 37$) comparável à da acetonitrila. É um bom solvente para compostos orgânicos, percloratos inorgânicos e fluoroboratos orgânicos. Entretanto é um solvente susceptível a hidrólise, produzindo dimetilamina, facilmente oxidável, e ácido fórmico. O DMF decompõe-se na destilação sob pressão atmosférica. Por esse motivo o caminho mais conveniente para a sua purificação é a passagem por uma coluna de alumina ativada; secagem sobre CuSO_4 anidro (remoção de aminas) e destilação sob pressão reduzida. O solvente em sua forma anidra é de difícil obtenção. A presença de N-metilformamida deve ser evitada, pois essa pode agir como doador de próton ou interferir no desenvolvimento das reações⁷⁴ No presente caso, o solvente foi submetido à destilação sob pressão reduzida, após tratamento com CuSO_4 anidro.

O perclorato de tetrabutylamônio, utilizado como eletrólito suporte nos estudos em meio aprótico, foi secado sob pressão reduzida a temperatura de 40°C.

4.2 – ESTUDOS ELETROQUÍMICOS

4.2.1 – VOLTAMETRIA CÍCLICA, VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL e VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA

Os estudos de voltametria dos compostos arilazoxilados, do berenil e da mecloretamina, foram realizados utilizando-se eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro de 3 mm), fio de platina e Ag/AgCl, Cl^- (0,1 mol L⁻¹) em um tubo com capilar

⁷⁴ LUND, H. *In Organic Electrochemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc; N. York, **1991**, cap.6, p. 296.

de Luggin com vycor na extremidade, como eletrodo de trabalho, auxiliar e de referência, respectivamente.

Em meio aprótico, utilizou-se *N,N*-Dimetilformamida (DMF) e perclorato de tetrabutylamônio (TBAP) ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrólito de suporte.

Em meio prótico, para o ácido calvático e seus análogos, foi utilizada uma solução aquosa tamponada com 20% de etanol para facilitar a solubilização dos compostos, pH aparente 6,9 ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$). Além do pH 6,9, foram realizados estudos voltamétricos com o ácido calvático (**1**) e seu análogo **2**, em pH aparente 4,5 e 5,6 tampão acetato, a fim de conhecer o comportamento desses compostos nesses meios anteriormente a análise deles em biossensor de DNA.

Estudos voltamétricos do berenil e da mecloretamina utilizaram apenas tampão acetato ($0,072 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOAc}$ e $0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ HOAc}$, força iônica = 0,100), pH aparente 4,5.

A análise dos dados foi realizada a partir de gráficos obtidos nos experimentos e tratados com o auxílio do programa Origin 6.0. O equipamento utilizado foi o Potenciostato/Galvanostato BAS modelo 100B e o AUTOLAB PGSTAT20.

Desenvolveu-se estudo da dependência do potencial de redução dos compostos **1** e **2** com o pH, utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), com o uso de eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro de 3 mm), platina e Ag/AgCl, Cl^- ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), como eletrodo de trabalho, auxiliar e de referência, respectivamente. Os experimentos foram realizados, utilizando-se uma solução aquoso-etanólica (8:2 V/V) tamponada, cujo pH variou entre 1,20 e 12,04. Os tampões usados foram preparados adicionando-se volumes conhecidos das soluções de eletrólitos 1 e 2, e completando-se o volume para 100 mL com água destilada de acordo com a Tabela 1. Os equipamentos utilizados foram o Potenciostato/Galvanostato BAS 100B e o pHmetro da MARCONI, mod. MAPA200, série 0113992.

Tabela 1. Soluções Tampões para eletrólito suporte.

Tampão (diluído para 100 mL)					
Solução do eletrólito 1	C (mol L ⁻¹)	Solução do eletrólito 2	C (mol L ⁻¹)	pH	Força iônica
KCl (25 mL)	0,20	+ HCl (42,5 mL)	0,20	1,20	0,135
KCl (25 mL)	0,20	+ HCl (6,5 mL)	0,20	2,02	0,063
NaOAc (3,7 mL)	0,20	+ HOAc (46,3 mL)	0,20	3,40	0,100
NaOAc (13,2 mL)	0,20	+ HOAc (36,8 mL)	0,20	4,30	0,197
NaOAc (7,2 mL)	1,00	+ HOAc (12,5 mL)	1,00	4,50	0,100
NaOAc (41,2 mL)	0,20	+ HOAc (8,8 mL)	0,20	5,40	0,100
Na ₂ HPO ₄ (6,15 mL)	0,20	+ NaH ₂ PO ₄ (43,85mL)	0,20	6,08	0,125
Na ₂ HPO ₄ (30,5 mL)	0,20	+ NaH ₂ PO ₄ (19,5 mL)	0,20	6,91	0,222
Na ₂ HPO ₄ (47,35 mL)	0,20	+ NaH ₂ PO ₄ (2,65 mL)	0,20	8,05	0,289
NaHCO ₃ (50 mL)	0,05	+ NaOH (2,5 mL)	0,10	9,25	0,041
NaHCO ₃ (50 mL)	0,05	+ NaOH (13,8 mL)	0,10	10,20	0,060
KCl (25 mL)	0,20	+ NaOH (6,0 mL)	0,20	12,04	0,062

A análise do efeito da concentração do ácido calvático **1** e seu análogo **2**, com a corrente de pico foi realizada em meio aquoso tamponado (tampão fosfato, pH 6,9) com 20% de etanol, utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial. Os eletrodos utilizados foram eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro de 3 mm), platina e Ag/AgCl, Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), como eletrodo de trabalho, auxiliar e de referência, respectivamente.

Foi realizado o estudo da estabilidade do ácido calvático acompanhando pela técnica de ultravioleta por 24 horas. Adicionou-se a cubeta de quartzo a solução tampão fosfato pH 6,9 contendo 20% de etanol e fez-se a varredura do branco na faixa de 200 a 500 nm. Logo em seguida adicionou-se a solução de ácido calvático $1 \cdot 10^{-4}$ mol L⁻¹ e obteve-se seu primeiro espectro. Esperou-se um tempo e depois foram realizadas várias medidas obtendo-se vários espectros até um tempo máximo de 24 horas.

4.2.2 – COULOMETRIA

As coulometrias foram realizadas em cela de vidro Pyrex (50 mL), com ânodo e cátodo separados. Como eletrodo de trabalho, utilizou-se feltro de carbono com dimensões de 2,0 cm x 2,5 cm x 0,5 cm. O eletrodo auxiliar constituiu-se de um espiral de platina isolada em um tubo de vidro contendo eletrólito suporte e fechado em sua extremidade inferior por um disco de vidro poroso. O eletrodo de referência utilizado foi o mesmo da voltametria cíclica, Ag/AgCl, Cl⁻ (0,100 mol L⁻¹).

Na coulometria do composto **4**, foram adicionados à cela 44 mL da solução de eletrólito de suporte contendo 30 mL da solução tampão pH aparente 6,9 (0,100 mol L⁻¹ Na₂HPO₄ e 0,100 mol L⁻¹ NaH₂PO₄) mais 14 mL de etanol. Essa solução de eletrólito foi desaerada durante 15 minutos, borbulhando-se nitrogênio. Esse nitrogênio passou, antes de entrar na cela, em um trap contendo etanol, a fim de saturá-lo evitando perdas por evaporação do etanol e conseqüentes mudanças na concentração. Em seguida, iniciou-se a pré-eletrólise dessa solução, em $E_{ap} = -0,500$ V, até que se atingisse uma corrente de aproximadamente 1 % da corrente inicial.

O composto **4** (0,00470 g – $0,48925 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹) foi dissolvido em 6,00 mL de etanol, adicionados à solução pré-eletrolisada da cela e a solução foi desaerada novamente por mais 10 minutos borbulhando-se nitrogênio. Procedeu-se a eletrólise em $E_{ap} = -0,400$ V até a corrente atingir valores suficientemente baixos, anotando-se as observações (mudança de coloração, aparecimento de precipitado, etc.). Todo o processo foi executado sob atmosfera de N₂ e com agitação magnética. Foram feitas três varreduras de voltametria cíclica utilizando os mesmos eletrodos, auxiliar e de referência, da coulometria, porém o eletrodo de trabalho utilizado foi o carbono vítreo. As varreduras foram: do eletrólito suporte depois da pré-eletrólise, da solução contendo o composto **4** antes da eletrólise e por fim da solução após o término da eletrólise.

No caso do berenil, realizaram-se duas eletrólises, uma em potencial positivo (oxidação) e outra em potencial negativo (redução). Foram adicionados à cela, 10 mL da solução tampão acetato, pH aparente 4,5 (0,072 mol L⁻¹ NaOAc e 0,125 mol L⁻¹ HOAc, força iônica = 0,100). Em seguida, iniciou-se a pré-eletrólise dessa solução, em $E_{ap} = +1,200$ V (oxidação) ou $E_{ap} = -1,100$ V (redução), até que se atingisse uma corrente de aproximadamente 1 % da corrente inicial. O Berenil

(0,01046 g – $2,0291 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹) foi dissolvido na solução eletrolisada da cela e procedeu-se a eletrólise em $E_{ap} = +1,100$ V (oxidação) ou $E_{ap} = -1,060$ V (redução), até a corrente atingir valores suficientemente baixos, anotando-se as observações (mudança de coloração, aparecimento de precipitado, etc.). Todo o processo foi executado sob agitação magnética e no caso da coulometria em potencial negativo (redução), além da agitação, realizou-se sob atmosfera de N₂, e antes da pré-eletrólise e da eletrólise a solução foi desaerada. Todo o processo foi acompanhado por voltametria cíclica mudando apenas o eletrodo de trabalho para carbono vítreo, sendo obtidas curvas do eletrólito de suporte depois da pré-eletrólise, da solução contendo o berenil antes da eletrólise e por fim da solução após o término da eletrólise.

Procedimento similar ao da coulometria do berenil foi seguido para a mecloretamina. Utilizaram-se 20 mL da solução tampão acetato, pH aparente 4,5, a massa usada foi 0,01006 g ($2,613 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹). Os potenciais aplicados foram: na pré-eletrólise $E_{ap} = +1,300$ V e na eletrólise $E_{ap} = +1,250$ V. Usou-se agitação magnética e também foram realizadas voltametrias antes e após a coulometria.

4.3 – ESTUDO ELETROQUÍMICO EM BIOSENSOR DE dsDNA

Desenvolveu-se todo o estudo eletroquímico do biossensor, com a utilização da técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), com o uso de eletrodo de carbono vítreo (BAS, diâmetro de 3 mm) modificado com dsDNA como eletrodo de trabalho, um fio espiralado de platina como eletrodo auxiliar e Ag/AgCl, Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹), em um tubo com capilar de Luggin com vycor na extremidade como eletrodo de referência. O experimento foi realizado utilizando-se uma solução tampão de ácido acético e acetato de sódio, pH=4,5. Os equipamentos utilizados foram o Potenciostato/Galvanostato AUTOLAB PGSTAT20 e o pHmetro da MARCONI, mod. MAPA200, série 0113992.

A solução tampão utilizada foi preparada utilizando-se água desionizada Milli-Q fervida e todas as vidrarias utilizadas foram previamente lavadas e submetidas a ultrassom com essa água fervida. Preparou-se uma solução de acetato de sódio 1,0 mol L⁻¹ e uma de ácido acético 1,0 mol L⁻¹; para obter pH=4,5

misturou-se 7,2 mL do NaOAc com 12,5 mL do HOAc em um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água desionizada previamente fervida.

4.3.1. ESPECIFICAÇÕES DO *dsDNA*

Sal de Sódio Tipo I, altamente polimerizado de Calf Thymus (Sigma, Saint Louis), dessecado, estocado a 2-8°C, teor de Sódio 6,2% e Água 13%.

4.3.2. PREPARAÇÃO DO GEL DE DNA

Pesou-se 18,75 mg de *dsDNA* e colocou-se em uma eppendorf juntamente com 0,5 mL de tampão acetato (3 mg de *dsDNA* / 80 μ L do gel). Guardou-se na geladeira por 24 horas.

4.3.3. PREPARAÇÃO DO BIOSSENSOR DE *dsDNA*

O eletrodo de carbono vítreo foi inserido em cela apropriada e colocado na posição vertical com a superfície virada para cima (Figura 30). Adicionou-se 10 mL de tampão acetato, pH 4,5, e o eletrodo foi submetido a várias varreduras na faixa positiva de potencial de 0 a +1,400 V. Após esse acondicionamento, retirou-se todo o tampão e aplicou-se, com o auxílio de uma micropipeta, 50 μ L do gel de DNA na superfície do eletrodo e esperou-se 24 horas, à temperatura ambiente, com a cela coberta com papel alumínio (para evitar contato com a luz, poeira e outras contaminações), até a secagem completa do gel.

O biossensor, assim preparado, foi imerso em tampão acetato (pH=4,5) e submetido a varreduras sucessivas em experimento de voltametria de pulso diferencial na região de potencial de 0 a +1,400 V até obtenção de resposta voltamétrica estável.

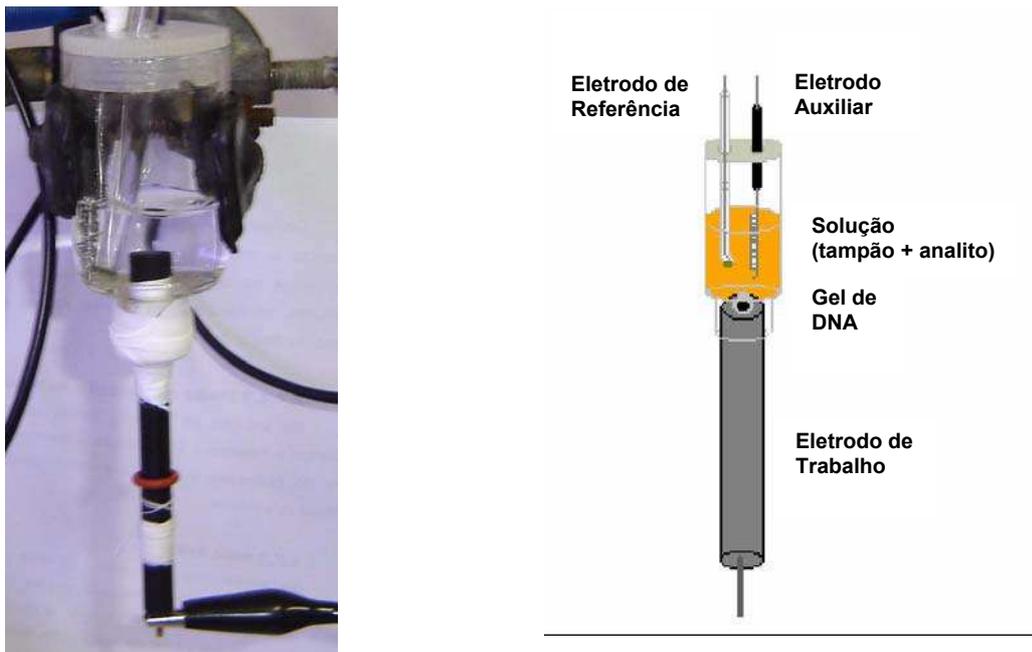


Figura 30. Representação da cela eletroquímica utilizada em biossensor de DNA.

Anteriormente à análise das substâncias estudadas em biossensor de *dsDNA*, preparou-se uma solução de *ssDNA* e fez-se a voltametria de pulso diferencial dessa solução em biossensor de *dsDNA*, com o objetivo de visualizar os picos de oxidação das bases do DNA.

4.3.4. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE *ssDNA*

Pesaram-se 3 mg do *dsDNA* e fez-se a desnaturação da molécula de *dsDNA*, mediante a adição de 0,5 mL ácido perclórico concentrado sob agitação e colocou-se imediatamente 0,5 mL de solução $9,0 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio para neutralização e por fim, adicionou-se a solução tampão até completar um volume de 10 mL. Essa solução foi adicionada à cela com o biossensor de *dsDNA* e submetida a varredura de VPD na faixa de 0 a +1,400 V.

Após a preparação do biossensor de *dsDNA*, seguiram-se duas principais metodologias para o estudo em presença do analito:

- O biossensor ficou em contato com 10 mL de uma solução de concentração conhecida da substância a ser analisada por 24 horas.
- Adicionou-se ao gel de *dsDNA*, já disposto na superfície eletródica, uma determinada quantidade em μL de uma solução do analito com concentração

conhecida, esperou-se 24 horas até secagem do biossensor e para adequada penetração da substância na matriz de DNA. Após esse tempo, adicionaram-se 10 mL de tampão acetato, pH = 4,5, e fez-se as análises através de voltametria de pulso diferencial.

As duas metodologias citadas foram acompanhadas por um biossensor preparado e submetido às mesmas condições experimentais, denominado branco. Nesse biossensor adicionou-se apenas a solução tampão sem o analito.

4.3.5. ÁCIDO CALVÁTICO

No estudo com a substância em solução, adicionou-se à cela em que o biossensor de *dsDNA* estava adaptado, 10 mL de uma solução do ácido calvático a uma concentração de $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão acetato com 20 % de Etanol e o biossensor foi submetido ao experimento de voltametria de pulso diferencial, inicialmente, na região de potencial de 0 a +1,400 V; e depois em faixas e direções de varreduras diferentes.

A segunda metodologia consistiu em adicionar 50 μL de uma solução $2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ do ácido calvático em tampão acetato com 20 % de Etanol, no gel de *dsDNA*. Após 24 horas, adicionaram-se 10 mL do tampão acetato e procedeu-se as varreduras de potencial pela técnica de VPD.

4.3.6. BERENIL

Avaliou-se a possível interação de *dsDNA* com o Berenil, em biossensor de *dsDNA*, por dois procedimentos diferentes:

1 – Adicionou-se ao gel de *dsDNA*, sobre o eletrodo, 50 μL de uma solução de Berenil nas concentrações: $1,94 \cdot 10^{-3}$; $1,0 \cdot 10^{-4}$; $1,0 \cdot 10^{-5}$; $5,0 \cdot 10^{-6}$ e $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; permanecendo em contato por 24 horas adicionais.

2 – Consistiu em adicionar à cela, contendo o biossensor de *dsDNA*, direcionado para cima, 10 mL de solução tamponada de berenil, $c = 1,0 \cdot 10^{-3}$; $1,0 \cdot 10^{-4}$; $1,0 \cdot 10^{-5}$ e $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; deixando-os em contato por algumas horas, com observação da alteração do voltamograma de pulso diferencial com o tempo de exposição.

Além dos procedimentos acima, avaliou-se também a possível interação do berenil com uma solução de ssDNA. Essa solução de ssDNA foi preparada como descrito acima e submetida a varredura de pulso diferencial na faixa de 0 a +1,400 V em carbono vítreo. Após essa varredura retirou-se da solução o eletrodo de carbono vítreo e fez-se um leve polimento. Condicionou-se esse eletrodo novamente em tampão acetato fazendo várias varreduras de VPD na faixa de 0 a +1,400 V e após esse condicionamento, ele foi retornado para a solução de ssDNA. Adicionou-se berenil a uma concentração de $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, e fez-se novamente a varredura de pulso diferencial na faixa de 0 a +1,400 V.

4.3.7. MECLORETAMINA EM SOLUÇÃO

Após o acondicionamento do biossensor, adicionaram-se 10 mL de uma solução de mecloretamina de concentração conhecida ($1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Fez-se uma primeira varredura no tempo zero do experimento (i.e. após contato imediato) e, em seguida, foram feitas varreduras em tempos de contato mecloretamina / biossensor variados, até o máximo de 24 horas de contato. Todas as varreduras foram realizadas utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial na região de potencial de 0 a +1,400 V.

4.3.8. MECLORETAMINA E TRIETILAMINA INCORPORADAS NO GEL DE DNA

Após o acondicionamento do biossensor, adicionaram-se 20 μL de uma solução contendo uma concentração conhecida do analito de acordo com a tabela 2. Após 24 horas de contato, adicionaram-se 10 mL do tampão acetato pH = 4,5 e observou-se o comportamento voltamétrico de cada um desses biossensores.

Tabela 2. Concentrações das soluções de mecloretamina e trietilamina adicionadas ao biossensor de dsDNA.

Substância	Concentração em mol L^{-1}
Mecloretamina	$2,0 \cdot 10^{-3}$; $1,0 \cdot 10^{-3}$; $1,0 \cdot 10^{-4}$; $5,0 \cdot 10^{-5}$; $1,0 \cdot 10^{-5}$
Trietilamina	$2,0 \cdot 10^{-3}$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DO ÁCIDO CALVÁTICO E ANÁLOGOS EM MEIO APRÓTICO E EM MEIO PRÓTICO. EFEITO DOS SUBSTITUINTES.

Grupos substituintes em moléculas eletroativas podem causar várias mudanças no comportamento eletroquímico. Em caso de correlação positiva entre o efeito do substituinte e os parâmetros eletroquímicos, há possibilidade de se prever propriedades redox de compostos substituídos similares, o que, em caso de substâncias bioeletroativas, pode auxiliar no planejamento de novos fármacos.

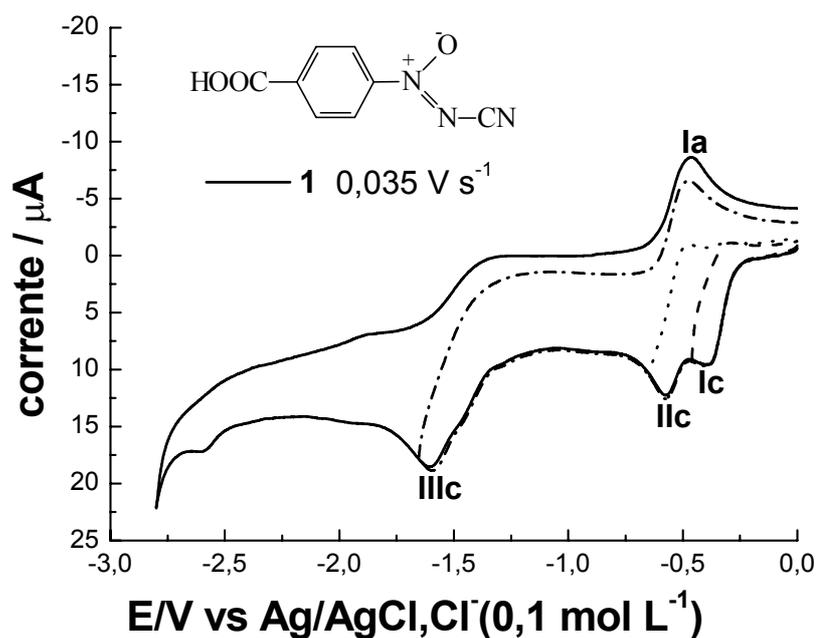
5.1.1 – REDUÇÃO ELETROQUÍMICA E EFEITO DOS SUBSTITUINTES EM MEIO APRÓTICO

A comparação das feições das curvas voltamétricas dos compostos **2**, **5-8** revelam comportamento eletroquímico similar, representado, para $v \leq 0,100 \text{ V s}^{-1}$, por um par de ondas monoeletrônicas (I_c e I_a), de natureza difusional ($I_p \propto v^{1/2}$) e reversível (E_{pc1} independente da velocidade de varredura, $I_{pa} / I_{pc1} \approx 1$, ΔE_p maior do que o valor esperado de $0,059 \text{ V}$, para uma transferência eletrônica reversível de um elétron, devido à queda ôhmica); seguido de uma segunda onda irreversível (I_{lc}) (E_{pc2} dependente da velocidade de varredura e ausência de onda anódica correspondente) de alta intensidade de corrente (Figuras 32-36).

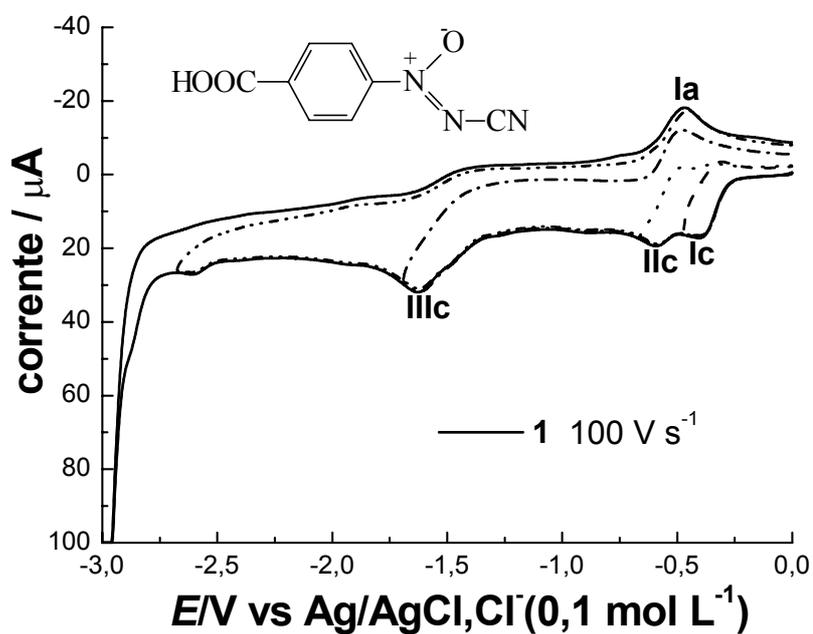
O Ácido Calvático (**1**) apresentou três ondas de redução bem definidas (Figura 31) e um mecanismo um pouco diferente dos outros, devido à presença do grupo carboxílico, dissociável. O mecanismo de autoprotonação explica o comportamento diferenciado e esse já foi examinado detalhadamente em trabalho já publicado⁷⁵. Em resumo, a primeira onda relaciona-se à redução do grupo azoxi, gerando um ânion-radical que sofre protonação a partir do ácido de origem.

Os voltamogramas cíclicos das substâncias estudadas e os gráficos de I_{pc1} vs $v^{1/2}$, I_{pc1} vs v , e E_{pc1} vs $\log v$, relativos à primeira onda de redução e E_{pc2} vs $\log v$ relativo à segunda onda de redução são mostrados nas figuras 32-36.

⁷⁵ DE PAULA, F. S. *et al.*, *J. Electroanal. Chem.*, **2003**, 544, 25.



A



B

Figura 31. Voltametria cíclica de **1** ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) em meio aprótico DMF / TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$.

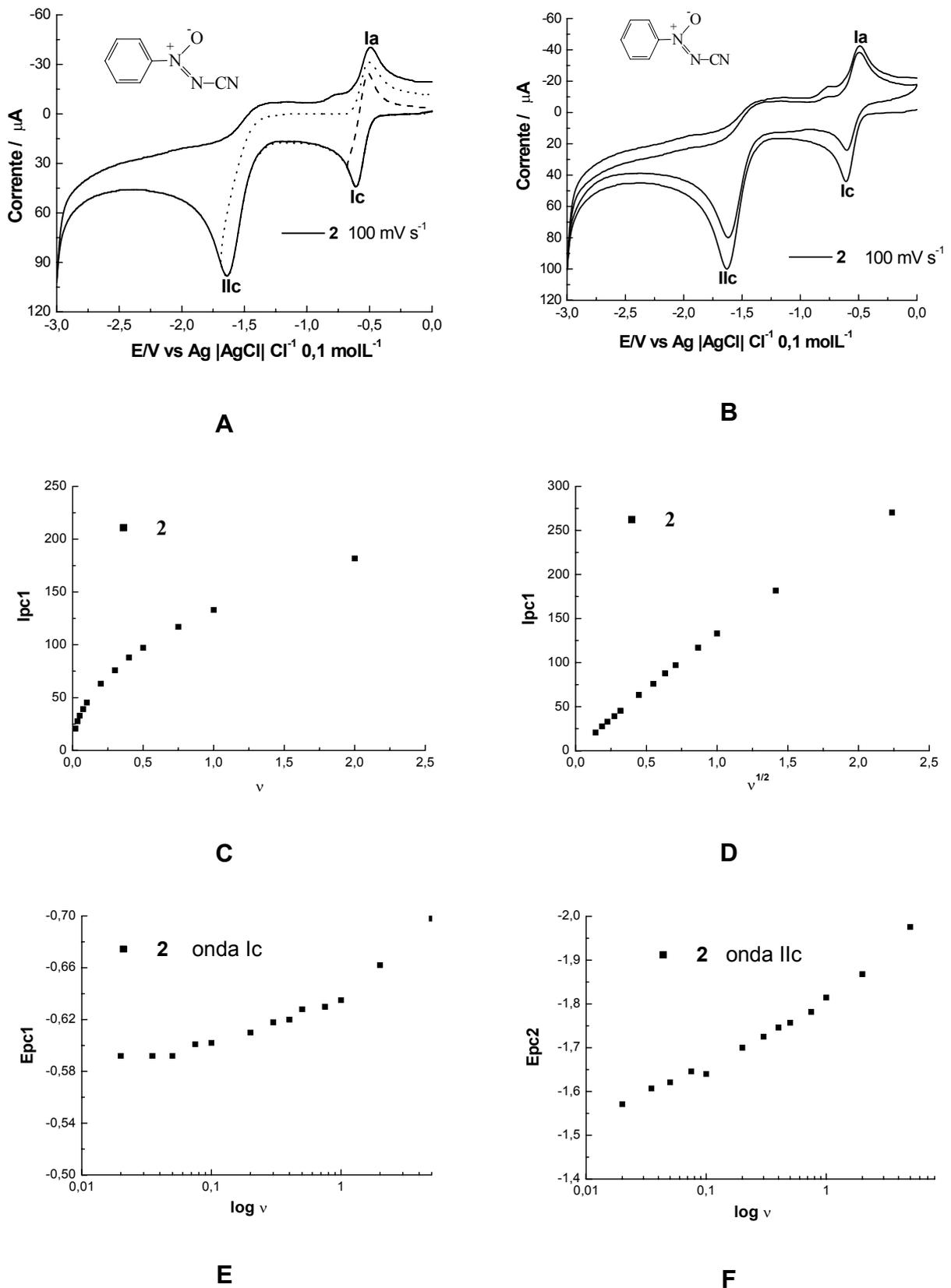


Figura 32. Voltametria cíclica de **2** ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) em meio aprótico DMF / TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, carbono vítreo. **A:** $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. **B:** Varreduras sucessivas a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. **C:** i_{pc1} vs v ; **D:** i_{pc1} vs $v^{1/2}$. **E:** E_{pc1} vs $\log v$, onda lc. **F:** E_{pc2} vs $\log v$, onda llc.

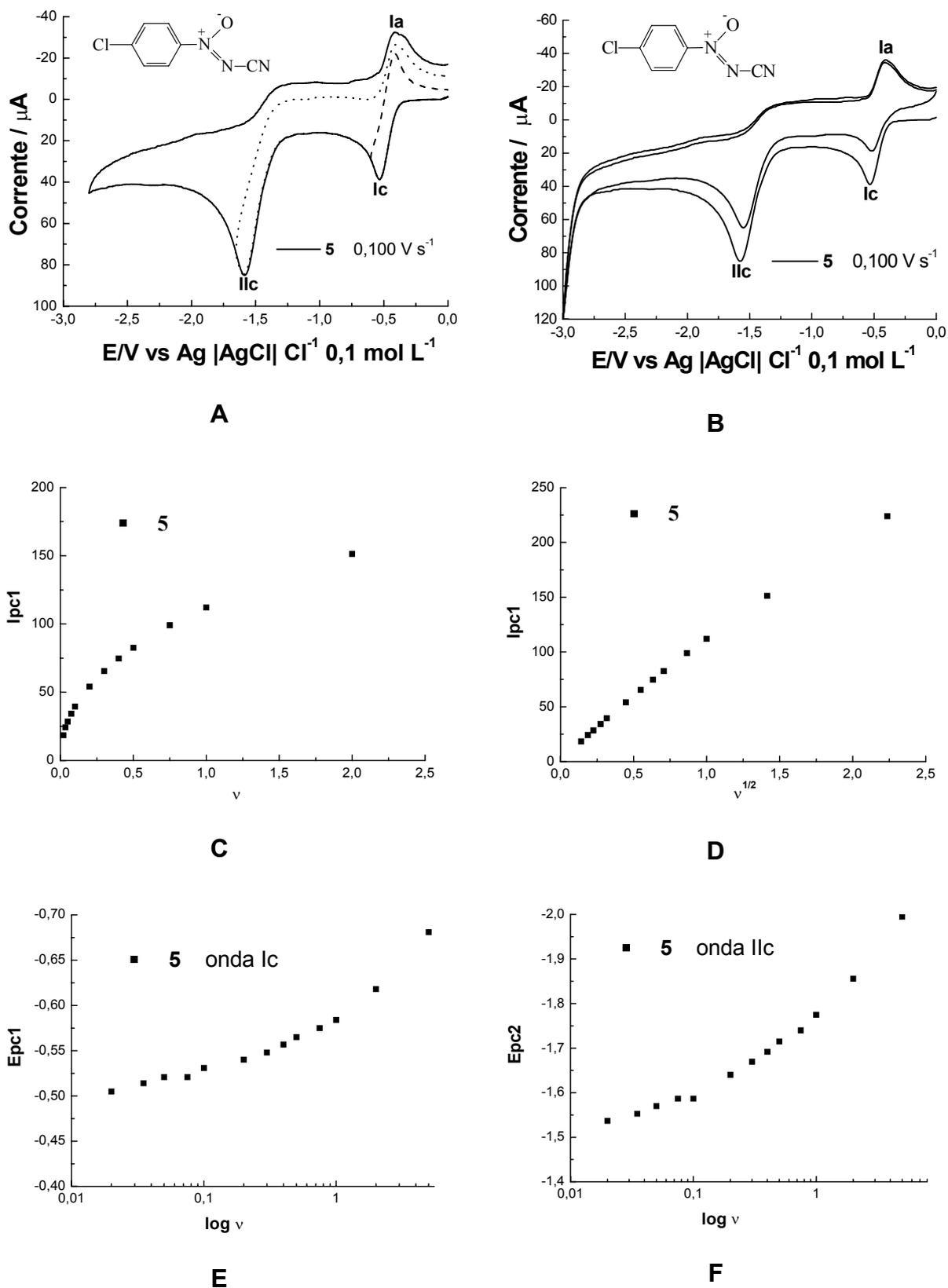
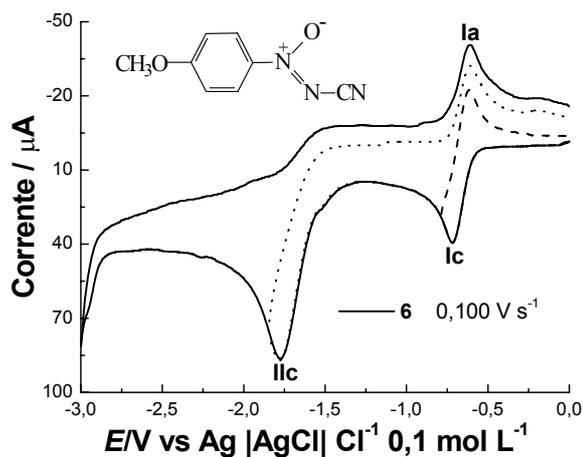
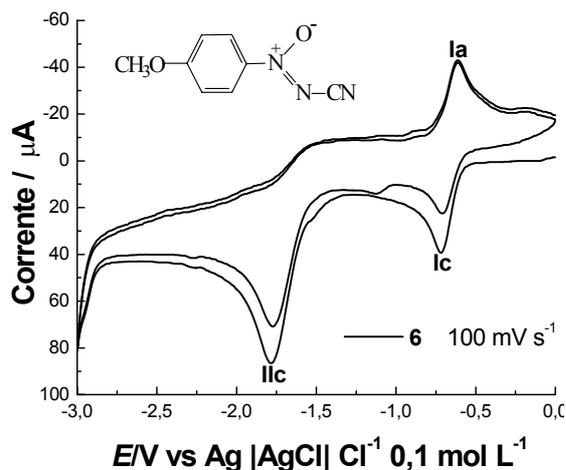


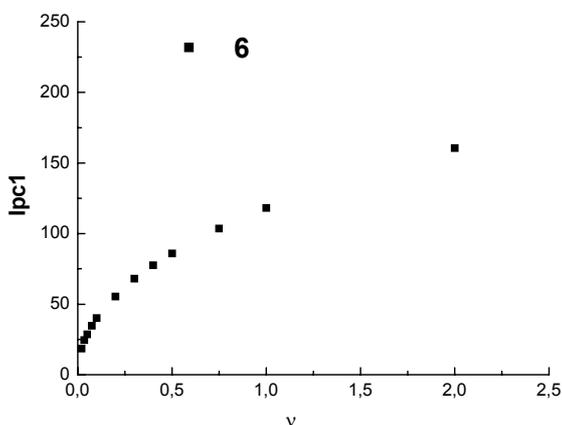
Figura 33. Voltametria cíclica de 5 ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) em meio aprótico DMF / TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, carbono vítreo. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varreduras sucessivas a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs v . D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log v$, onda I_c . F: E_{pc2} vs $\log v$, onda II_c .



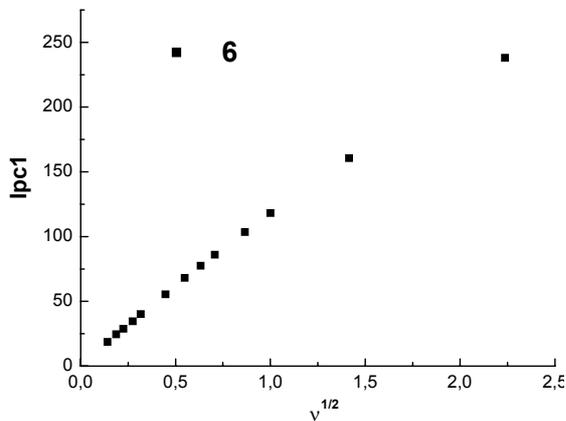
A



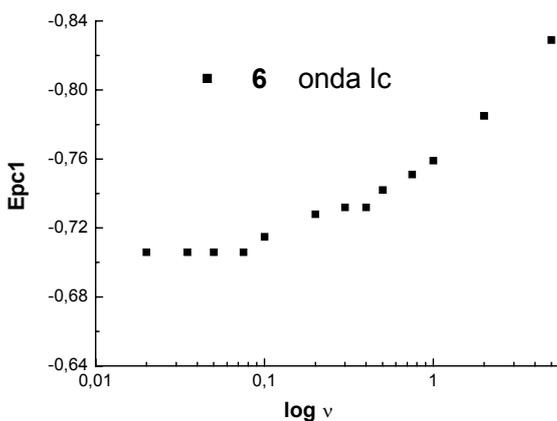
B



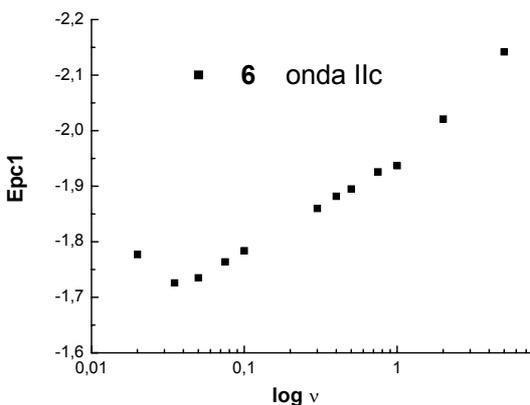
C



D



E



F

Figura 34. Voltametria cíclica de **6** ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) em meio aprótico DMF / TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, carbono vítreo. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varreduras sucessivas a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs v . D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic. F: E_{pc2} vs $\log v$, onda Ic.

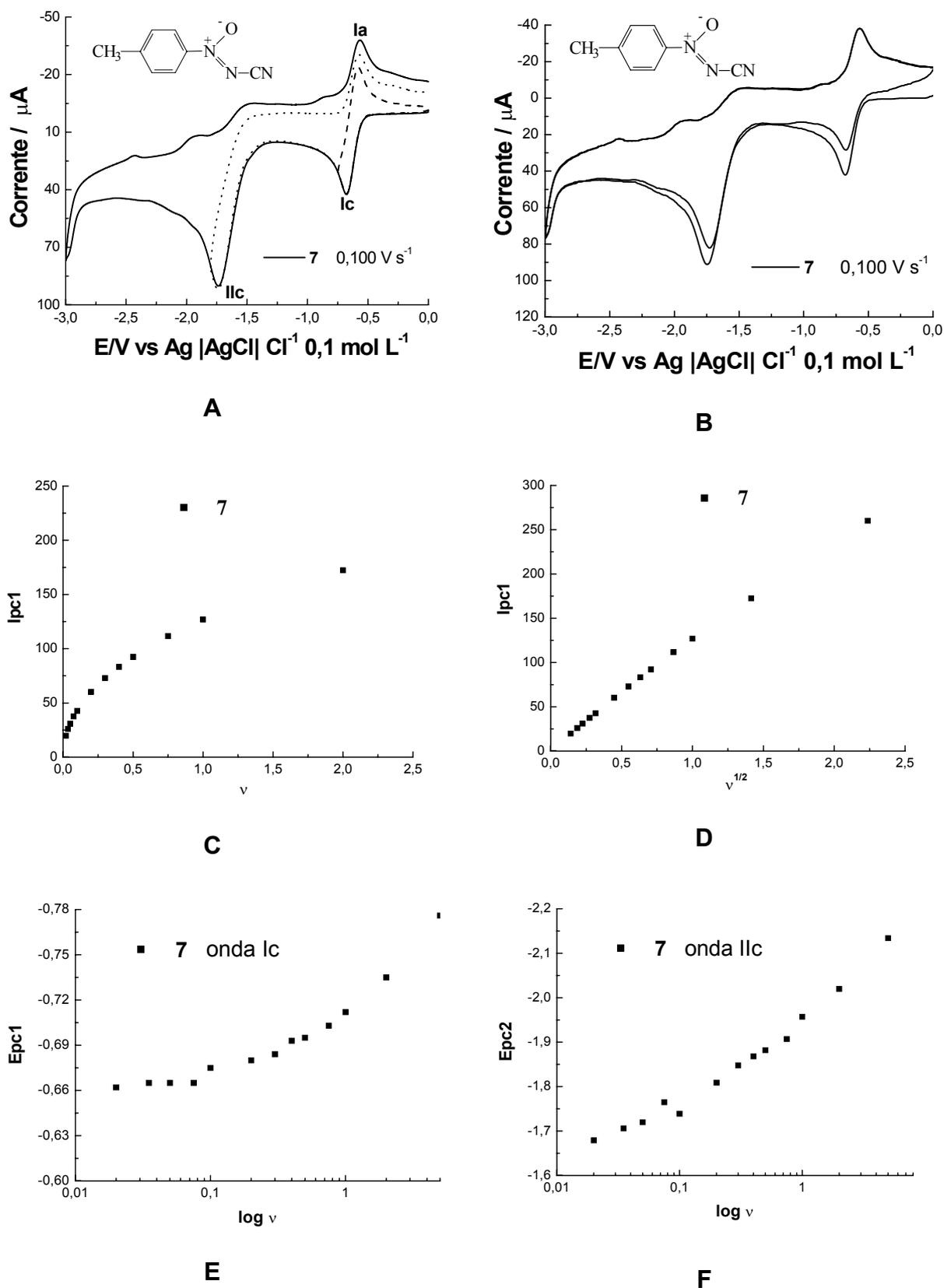


Figura 35. Voltametria cíclica de **7** ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) em meio aprótico DMF / TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, carbono vítreo. **A:** $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. **B:** Varredura sucessiva a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. **C:** I_{pc1} vs v . **D:** I_{pc1} vs $v^{1/2}$. **E:** E_{pc1} vs $\log v$, onda lc. **F:** E_{pc2} vs $\log v$, onda llc.

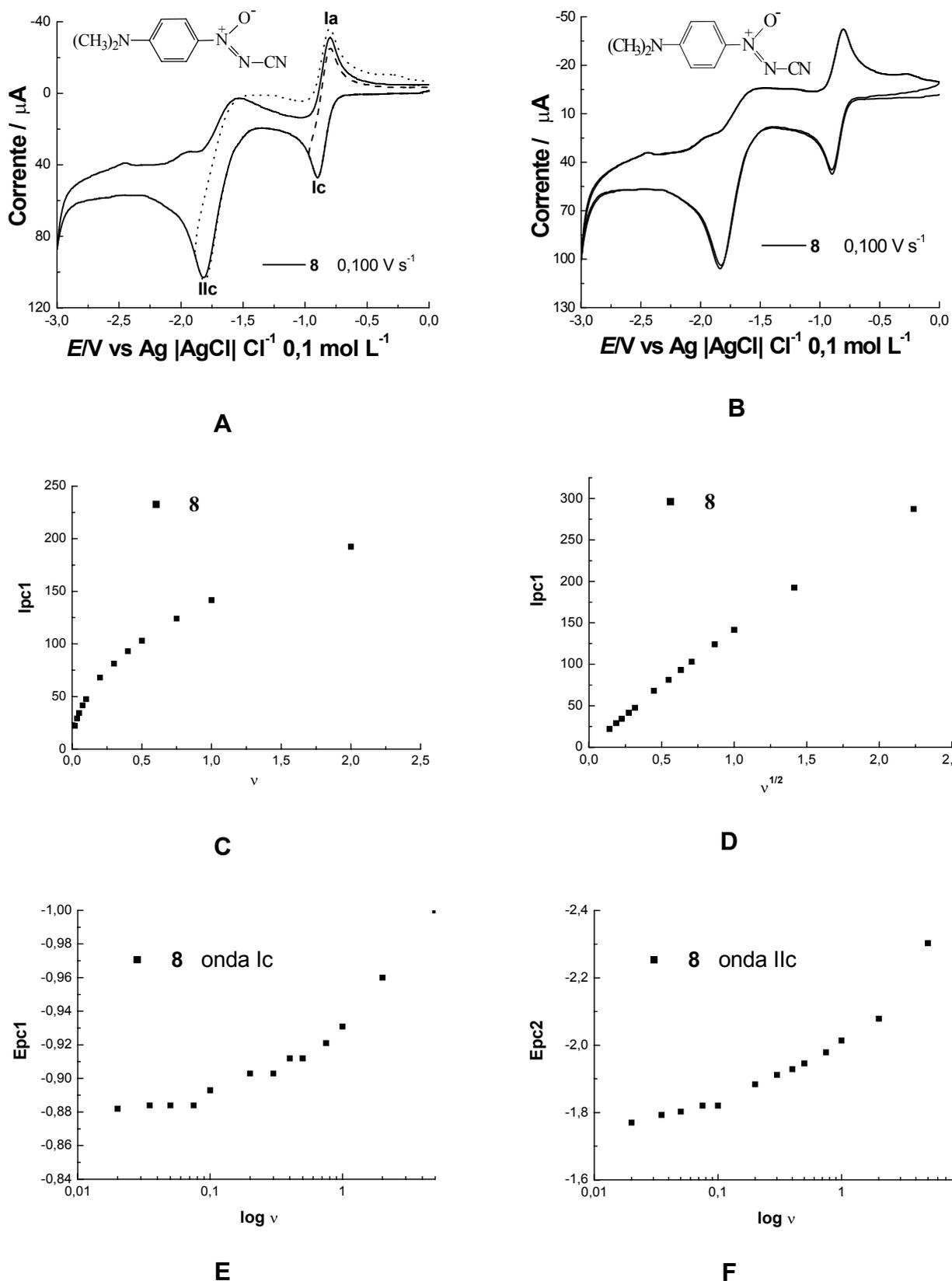


Figura 36. Voltametria cíclica de **8** (0,002 mol L⁻¹) em meio aprótico DMF / TBAP 0,1 mol L⁻¹, carbono vítreo. A: $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varredura sucessiva a $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs ν . D: I_{pc1} vs $\nu^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log \nu$, onda **lc**. F: E_{pc2} vs $\log \nu$, onda **llc**.

O composto **3** (Figura 37), além das duas ondas comuns aos outros compostos, apresentou uma terceira onda de redução em potencial mais negativo, que se refere à redução do grupo CN.

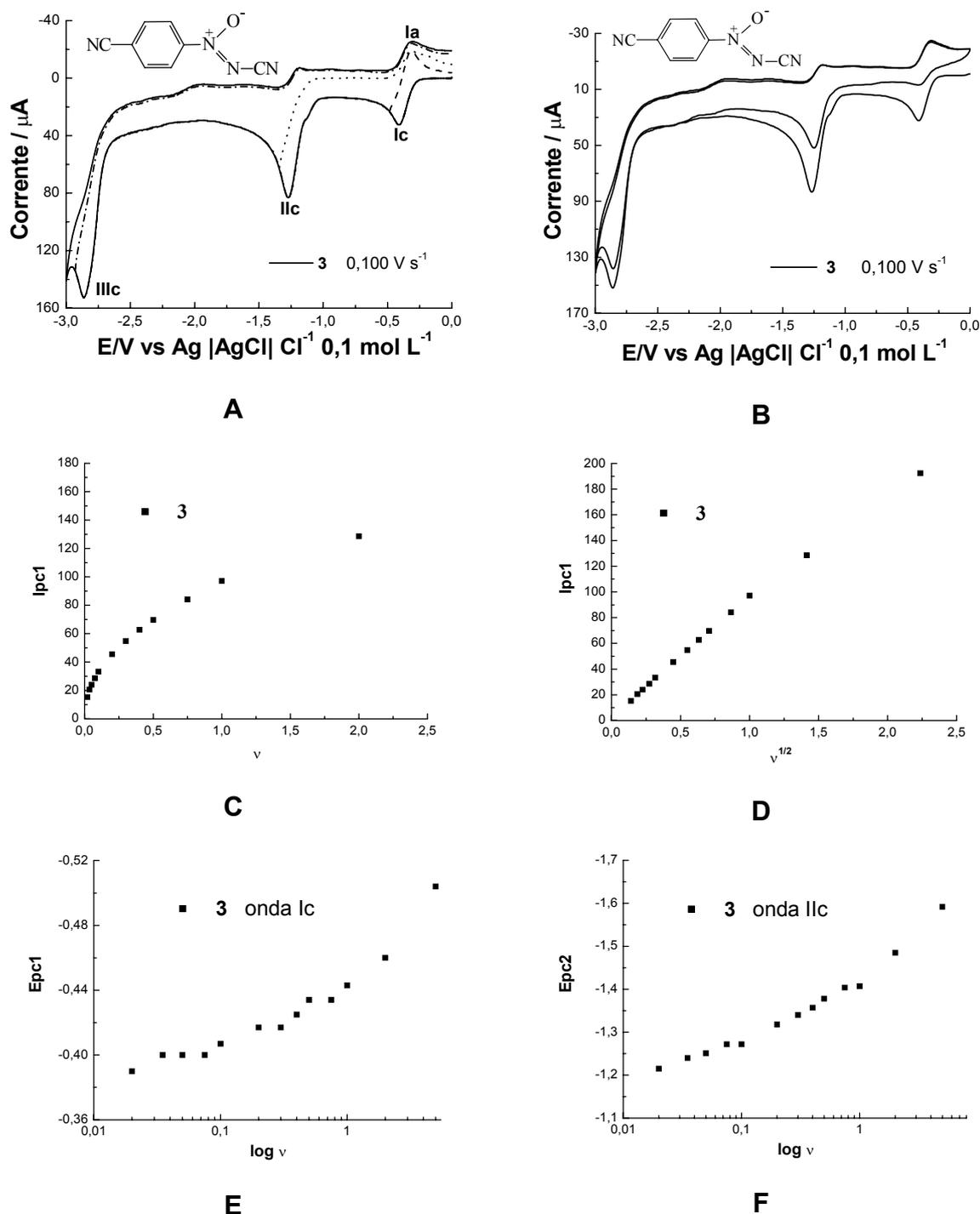
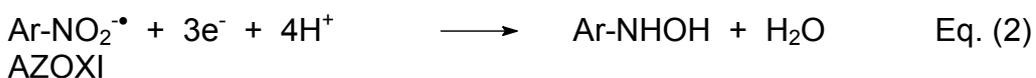


Figura 37. Voltametria cíclica de **3** ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) em meio aprótico DMF / TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, carbono vítreo. A: $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varreduras sucessivas a $\nu = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs ν . D: I_{pc1} vs $\nu^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log \nu$, onda Ic. F: E_{pc2} vs $\log \nu$, onda IIc.

O composto **4** (Figura 38) apresentou duas ondas de redução de pequena intensidade de corrente (Ic e IIc), de natureza difusional ($I_p \propto v^{1/2}$) e reversível (E_{pc1} e E_{pc2} independentes da velocidade de varredura, $I_{pa} / I_{pc1} \approx 1$, ΔE_p maior do que o valor esperado de 0,059 V, para uma transferência eletrônica reversível de um elétron), relativas a transferência de um elétron cada uma; seguidas de uma terceira onda (IIIc) de alta intensidade de corrente e irreversível (E_{pc3} dependente da velocidade de varredura e ausência de onda anódica correspondente). Ondas adicionais apareceram devido à presença de grupo eletroativo adicional, o grupo nitro, e esse é o motivo da terceira onda ter uma intensidade tão alta. Ao compararmos as correntes das três ondas de redução, observamos que as ondas Ic e IIc têm valores semelhantes, enquanto que a onda IIIc é praticamente 6 vezes maior. Como os grupos azoxi e nitro têm comportamentos parecidos em meio aprótico, onde se observa uma primeira onda monoelétrica reversível referente à formação de um ânion radical, seguida de uma terceira onda de intensidade três vezes maior que a primeira relativa à captura de mais três elétrons, podemos sugerir que as ondas Ic e IIc referem-se a formação de ânions radicais correspondentes a cada grupo eletroativo (azoxi e nitro) e a onda IIIc seria correspondente a seis elétrons relativa à redução posterior dos dois grupos, que ocorre em potenciais semelhantes.

NITRO



AZOXI



Figura 38. Mecanismo simplificado de redução de compostos nitroaromáticos e arilazoxicianetos em meio aprótico.

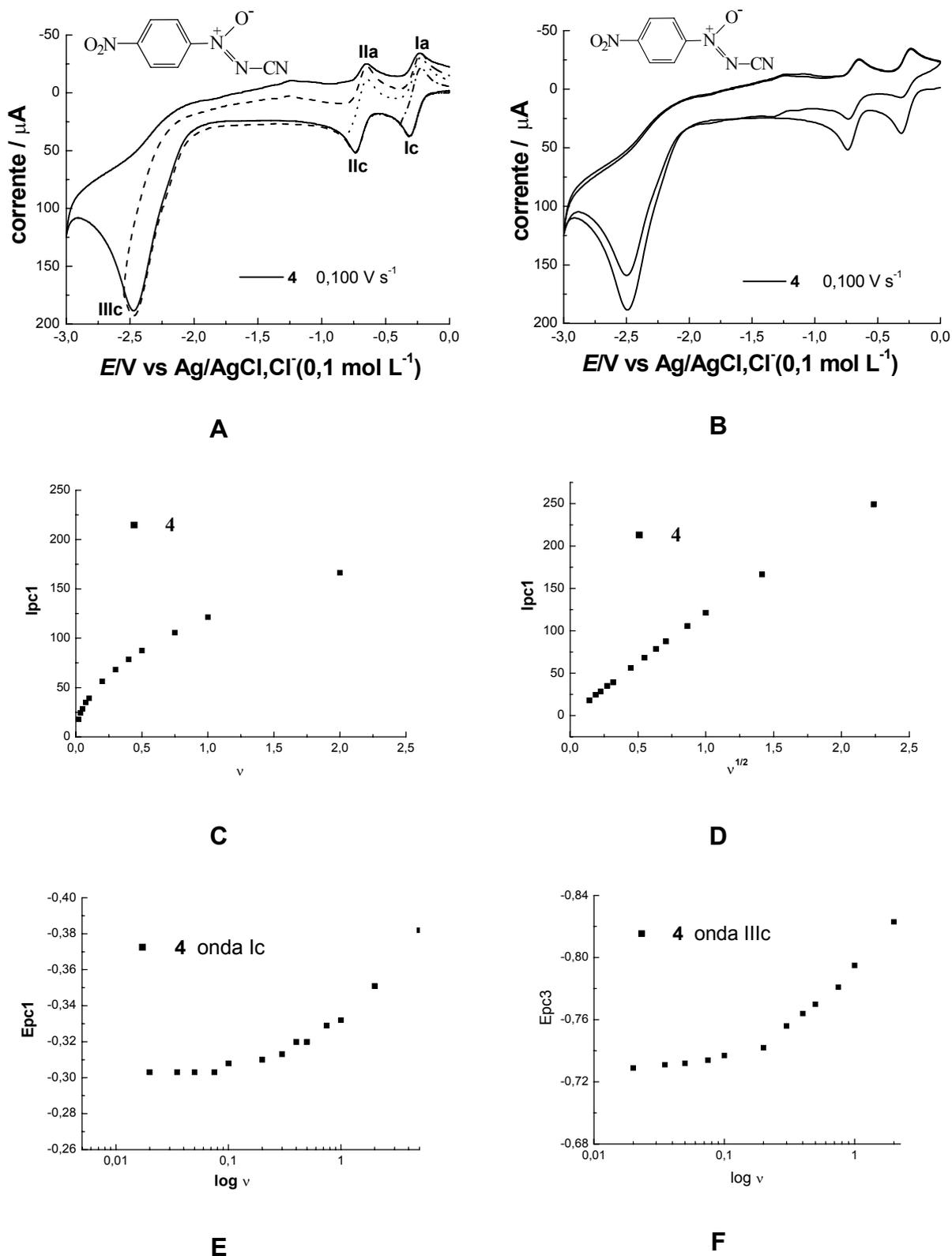


Figura 39. Voltametria cíclica de 4 ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) em meio aprótico DMF / TBAP $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, carbono vítreo. A: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Varredura sucessiva a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs v . D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic. F: E_{pc3} vs $\log v$, onda IIIc.

Substituintes eletroatraentes no anel aromático em posição *para* ao grupo eletroativo, diminuem a densidade eletrônica em torno desse grupo, facilitando assim, a redução. No presente caso não foi diferente, os compostos com substituintes eletroatraentes (**2-5**) tiveram potenciais menos negativos e os com substituintes eletrodoadores (**6-8**) tiveram potenciais mais negativos, seguindo a ordem esperada das constantes σ_p e $\sigma_p(\sigma^-)$ de Hammett^{26,76,77,78,79} do substituinte no anel aromático:



Em termos eletroquímicos, a comparação com o grupo -COOH não pôde acontecer, uma vez que o mecanismo eletródico segue outro caminho, sofrendo o efeito do próton ácido⁷⁵.

Em meio aprótico, onde, obviamente, a concentração hidrogeniônica é menor, a primeira captura eletrônica gera um anion-radical estável, que sofre uma segunda captura eletrônica, e origina uma espécie muito básica capaz de abstrair prótons do meio, e acaba por gerar os derivados diazocianeto dos substratos por desidratação (Figura 39). Os compostos resultantes reduzem-se mais facilmente, permitindo, então, um processo redutivo adicional, em potencial semelhante ao anterior, o que origina o derivado hidrazo. A corrente da segunda etapa é limitada pela velocidade de protonação do diânion azoxi eletrogerado.

⁷⁶ O. Exner in *Correlation Analysis in Chemistry*, N. B. Chapman and J. Shorter (eds.). Plenum Press, New York, **1978**, Chap. 10.

⁷⁷ ISAACS, N. S.; *Physical Organic Chemistry*, 2nd edition, Longman Scientific & Technical, **1995**, pp 152-153.

⁷⁸ SWAIN, C. G. and LUPTON, E. C., *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 4328, **1968**.

⁷⁹ BROWN, H. C. and OKAMOTO, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 4979, **1958**.

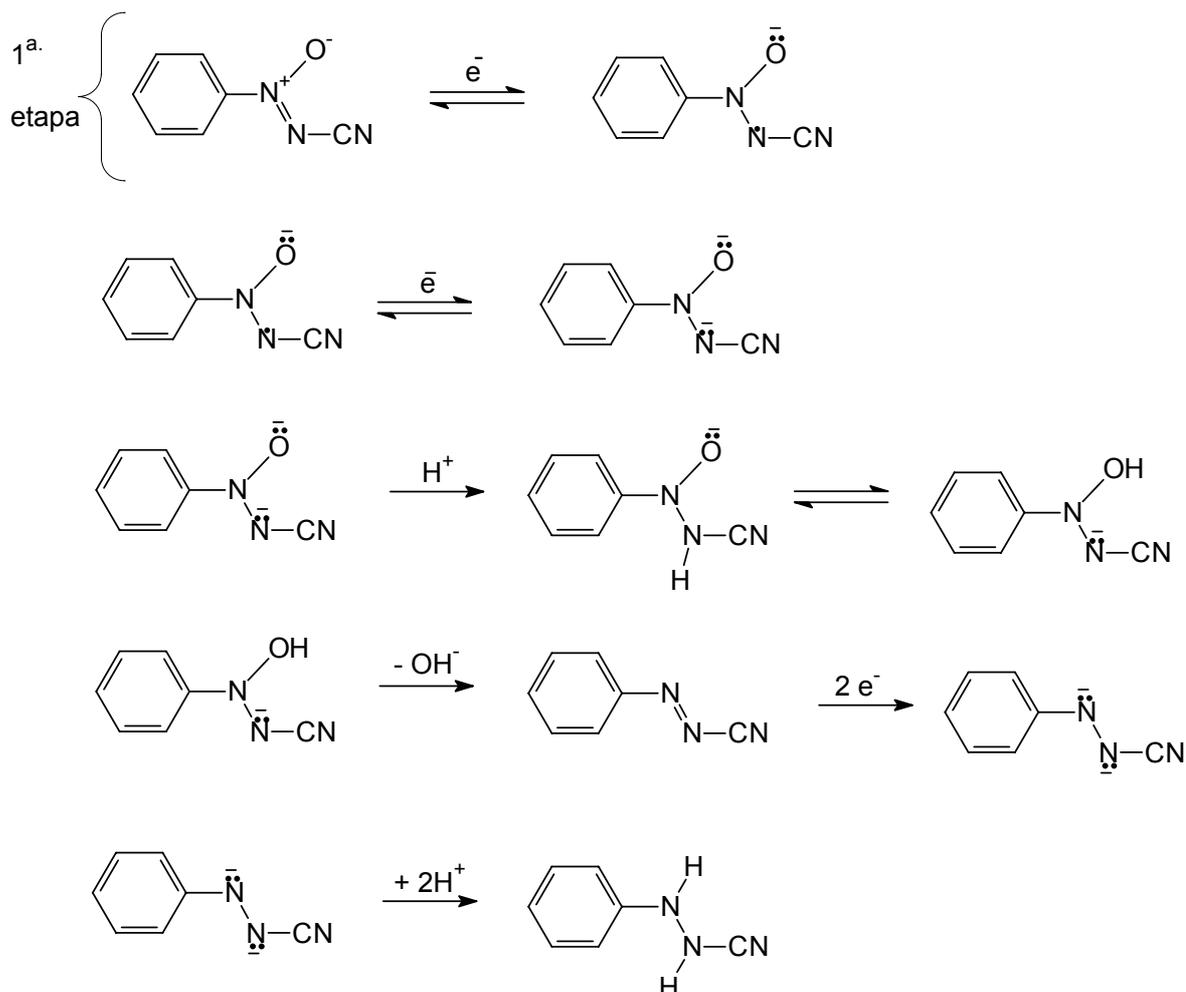


Figura 40. Provável mecanismo para a redução de azoxi- e azocianetos em meio aprótico⁸⁰.

Muitos processos eletroquímicos mostraram uma boa correlação com as constantes dos substituintes de Hammett^{24,81}. Não é surpresa que um processo eletroquímico que envolve adição ou remoção de elétrons a um grupo de uma determinada molécula orgânica poderia correlacionar com a habilidade de substituintes em aumentar ou diminuir a densidade eletrônica deste grupo.

Os potenciais de redução (E_{pc1}) dos compostos obtidos por Voltametria Cíclica, em meio aprótico, foram comparados, de acordo com os substituintes no anel aromático, com os valores σ_p e $\sigma_p(\sigma^-)$ de Hammett^{26,76,77,78,79} (Tabela 3, ver gráficos da Figura 41). Considerando-se que todos os substituintes estão em posição *para*, disponível para exercer importantes efeitos ressonantes, e que a redução forneceria intermediários carregados negativamente, constantes de substituintes de Hammett, σ ,

⁸⁰ SIMONET, J.; GUEGUEN-SIMONET, N. in S. Patai (Ed.), *The chemistry of the hydrazo, azo and azoxy groups*, John Wiley & Sons, NY, **1997**. pp. 429-434.

⁸¹ ALSTON, J. Y.; FRY, A. J., *Electrochimica Acta*, **2004**, 455, 49.

para grupos fortemente eletroatraentes foram extraídos da referência 26 e usados na correlação. Calculou-se, com a ajuda do software (Origin 6.0), a melhor reta entre os pontos, obtendo-se os coeficientes de correlação linear (R).

Tabela 3. Principais parâmetros eletroquímicos. Eletrodo de Carbono Vítreo, E_p vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}|0,1 \text{ molL}^{-1} \text{ Cl}^-$, $\nu = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$. Meio aprótico. Constantes de Hammett.

Comp.	Meio Aprótico (DMF + 0,1 mol L ⁻¹ TBAP)						Constantes de Hammett	
	E_{pc1}/V	E_{pa1}/V	$\Delta E_p/V$	E_{pc2}/V	E_{pa2}/V	E_{pc3}/V	σ_p ^{76,77}	$\sigma_p(\sigma^-)$ ^{a 26, 78,79}
-NO ₂ (4)	-0,311	-0,226	-0,085	-0,738	-0,643	-2,464	0,78	(1,24)
-CN (3)	-0,414	-0,330	-0,084	-1,262	—	-2,855	0,71	(0,96)
-Cl (5)	-0,541	-0,426	-0,115	-1,581	—	—	0,24	(0,227)
-H (2)	-0,607	-0,523	-0,084	-1,639	—	—	0	0
-CH ₃ (7)	-0,676	-0,584	-0,092	-1,742	—	—	-0,14	-0,17
-OCH ₃ (6)	-0,716	-0,620	-0,096	-1,764	—	—	-0,27	-0,268
-N(CH ₃) ₂ (8)	-0,905	-0,803	-0,102	-1,817	—	—	-0,32	(-0,83)

a) Os valores entre parênteses⁸² são σ^- .

⁸² KUBOTA, T.; *et al.*; *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, 31, 373.

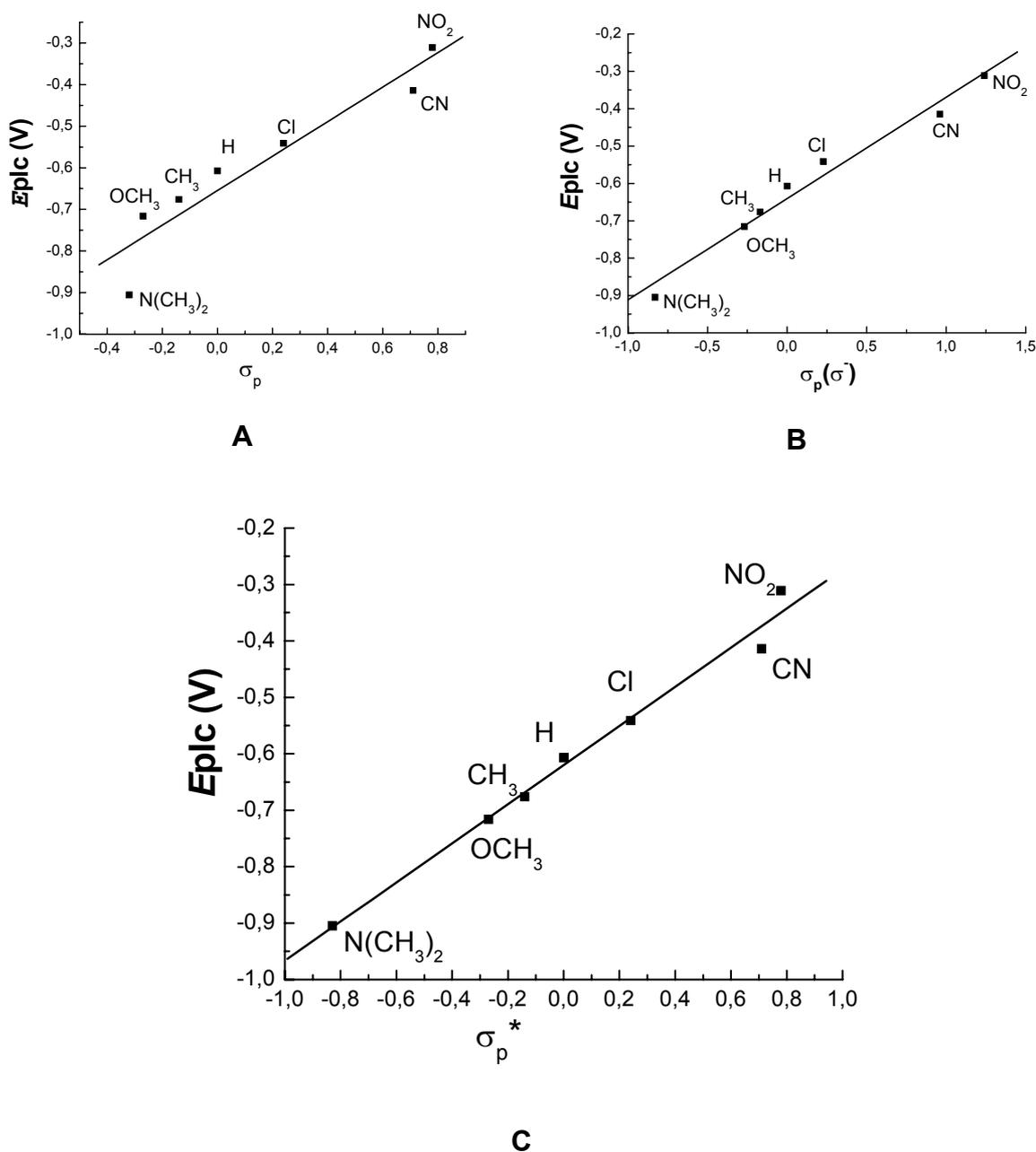


Figura 41. Gráficos de correlação E_{p1c} dos compostos 2-8 vs. constantes de substituintes de Hammett.

Para o meio aprótico, os valores de R foram consideravelmente melhores para $\sigma_p(\sigma^-)$ [$R = 0,988 (0,033)$] (Figura 41 B), levando a seguinte equação: $E_{p1c} = -0,641 (0,013) + 0,271 (0,019) \sigma_p(\sigma^-)$.

Utilizando o σ_p usual, obtém-se um coeficiente de correlação mais baixo para E_{p1c} [$R = 0,948 (0,068)$] (Figura 41 A). Um gráfico foi construído utilizando σ_p vs E_{p1c} e mudando o valor de σ_p (-0,32) do grupo dimetilamino para $\sigma_p(\sigma^-)$ (-0,83) e uma excelente correlação linear foi obtida [$R = 0,993 (0,037)$] (Figura 41 C). Os valores

dos potenciais de redução correlacionaram melhor com $\sigma_p(\sigma^-)$ devido aos intermediários formados após redução estarem carregados negativamente e por estarem os substituintes na posição *para*, quando podem exercer uma interação ressonante direta com o sítio reacional rico em elétrons.

5.1.2 – REDUÇÃO DO ÁCIDO CALVÁTICO E DE ANÁLOGOS EM MEIO PRÓTICO E O EFEITO DOS SUBSTITUINTES.

Em meio aquoso-etanólico tamponado, pH $7,0 \pm 0,2$, a feição dos voltamogramas dos compostos analisados (exceto **4**) mostra um sistema bem definido, constituído de uma onda catódica intensa (de controle difusional I_{pc1} vs $v^{1/2}$), denominada I_c (Figura 42), seguida de uma onda anódica menos intensa (I_a), no ciclo reverso. Em varredura de dois ciclos, uma segunda onda catódica torna-se evidente (I_{lc}), em potencial mais positivo e está relacionada com I_a . Os gráficos de E_{pc1} vs $\log v$ mostraram que o potencial é dependente da velocidade de varredura e, também, a razão I_{pa}/I_{pc} não é igual a 1 (um), portanto o sistema não é reversível simples. A primeira onda corresponde à captura de quatro elétrons conforme estudo realizado anteriormente⁷⁵. As ondas I_a e I_{lc} representam um sistema quase-reversível, a sugerir a transferência de dois elétrons.

O Ácido Calvático apresentou um comportamento diferente dos seus similares e por isso não foi incluído nesse estudo do efeito do substituinte no potencial de redução. Em seções posteriores, o comportamento eletroquímico do Ácido Calvático em meio prótico, será discutido isoladamente.

As figuras 42-48 apresentam os voltamogramas cíclicos obtidos nas velocidades de $0,035 \text{ V s}^{-1}$ e $0,100 \text{ V s}^{-1}$ para as substâncias estudadas e os gráficos de I_{pc1} vs $v^{1/2}$, I_{pc1} vs v , e E_{pc1} vs $\log v$, relativos à onda de redução I_c .

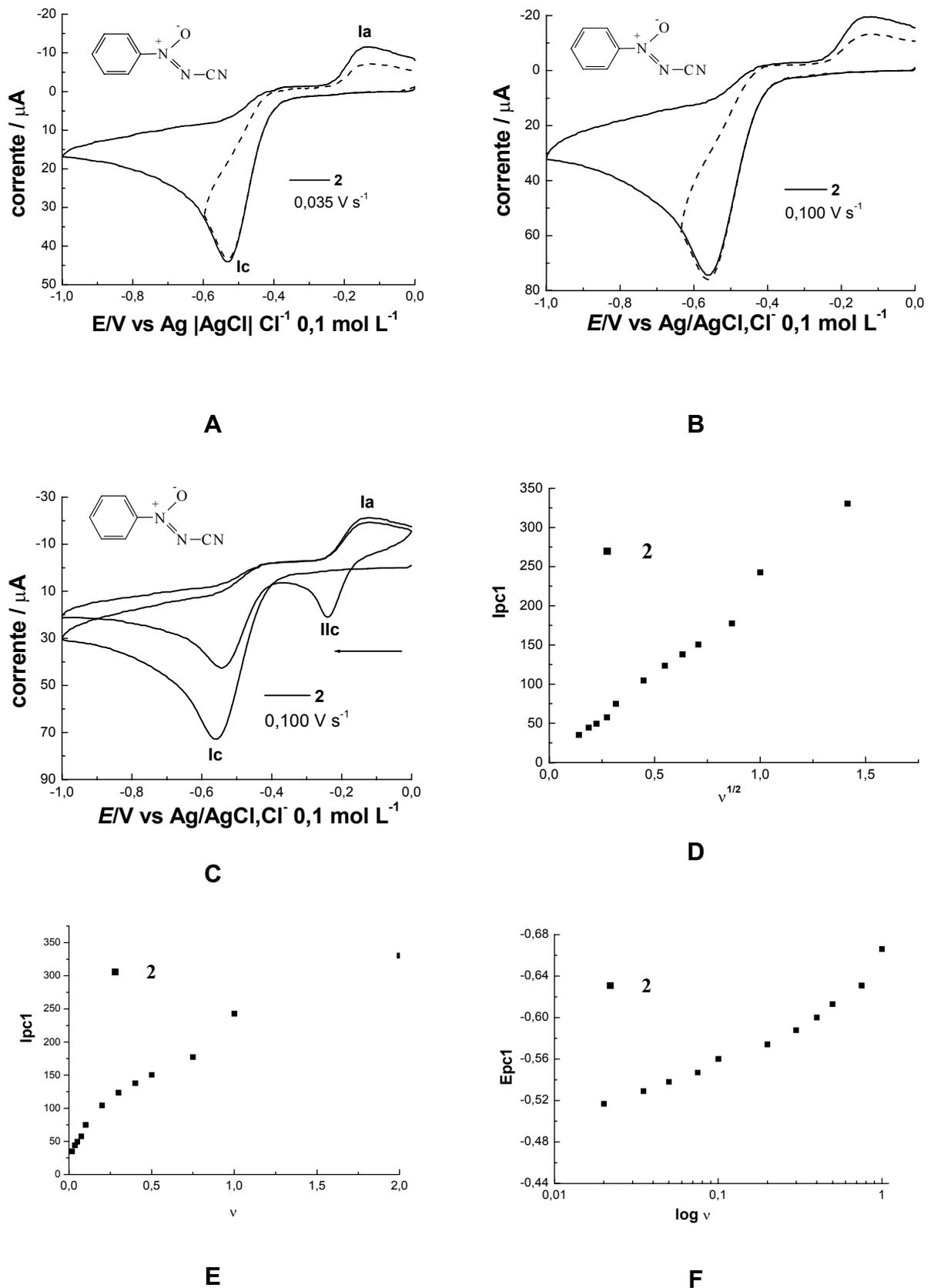


Figura 42. Voltametria cíclica de **2** ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,9$, carbono vítreo. **A**: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. **B**: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. **C**: Varredura sucessiva a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. **D**: $I_{pc1} \text{ vs } v^{1/2}$. **E**: $I_{pc1} \text{ vs } v$. **F**: $E_{pc1} \text{ vs } \log v$, onda lc.

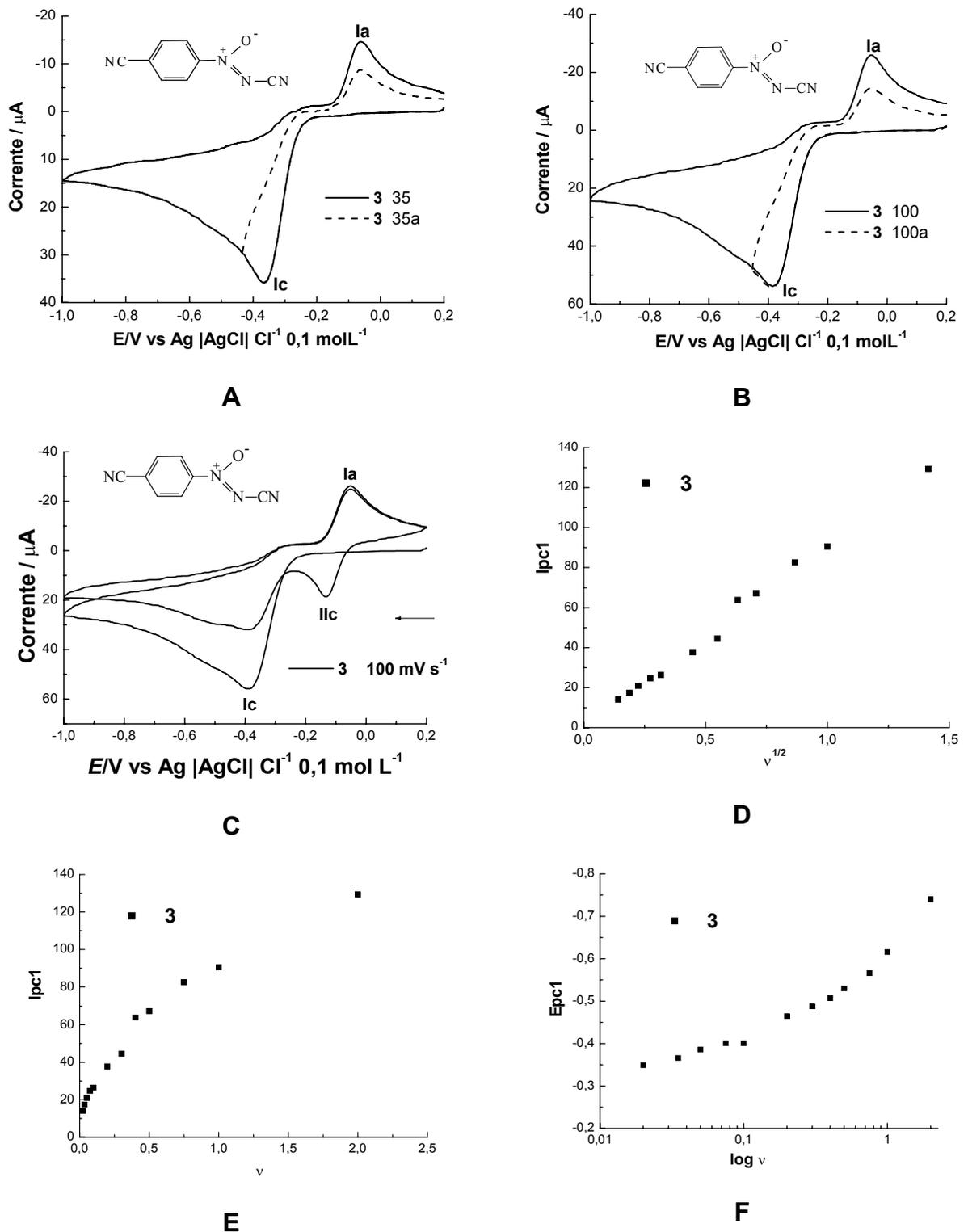


Figura 43. Voltametria cíclica de 3 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico tamponado (tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,9, carbono vítreo). A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: Varreduras sucessivas a $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. D: i_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: i_{pc1} vs v . F: E_{pc1} vs $\log v$, onda lc.

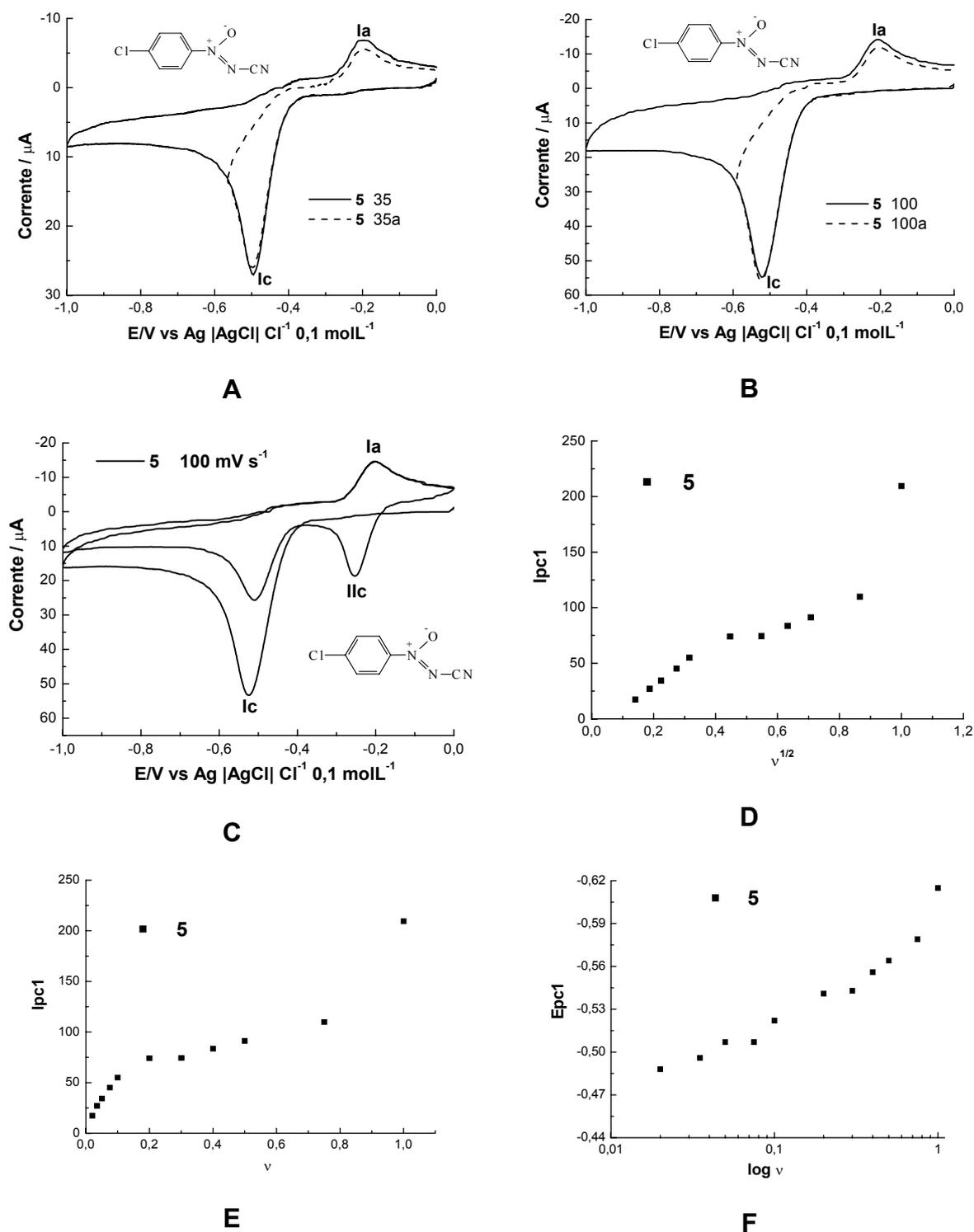


Figura 44. Voltametria cíclica de 5 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 6,9, carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: Varredura sucessiva em $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. D: i_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: i_{pc1} vs v F: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic.

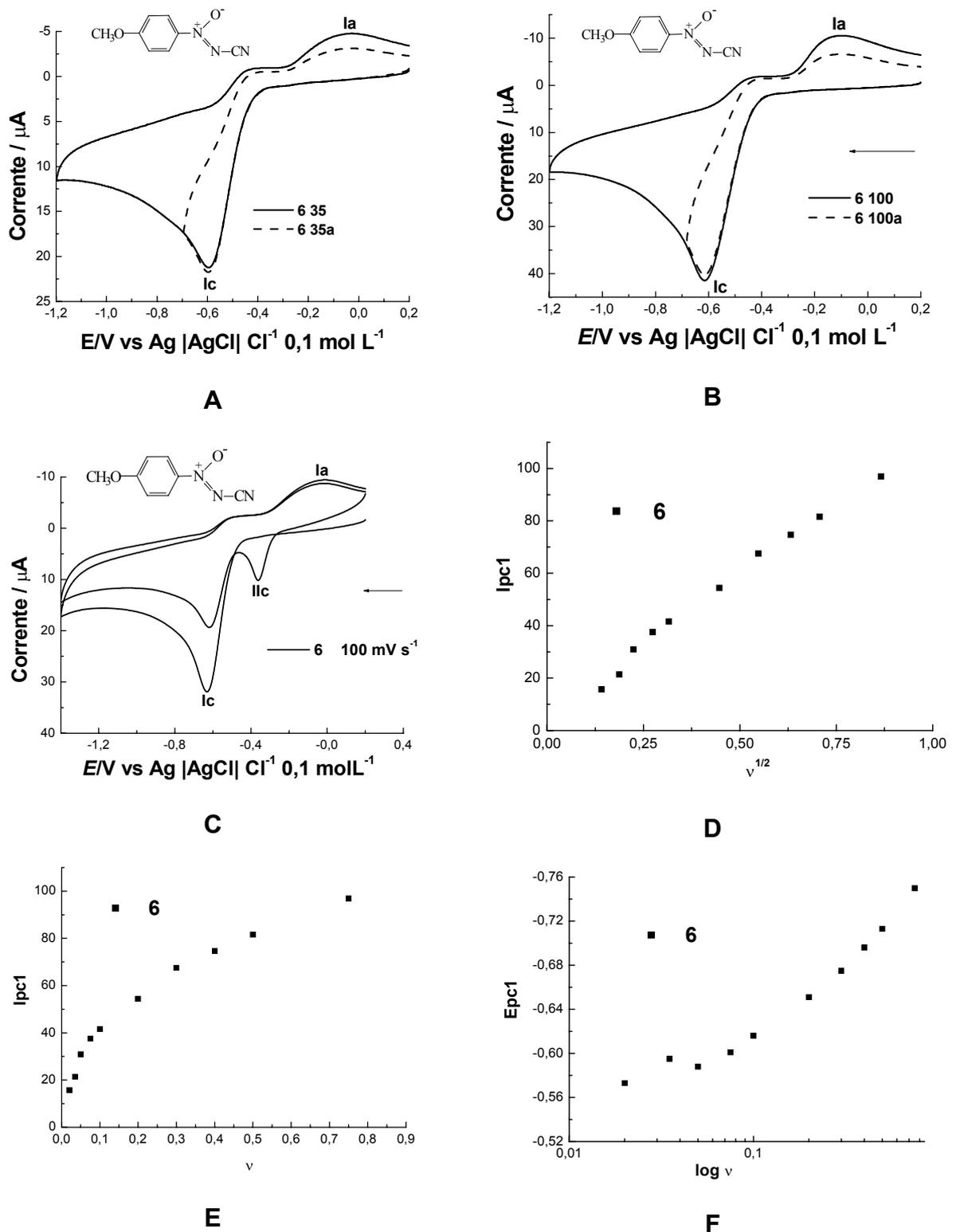


Figura 45. Voltametria cíclica de 6 ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 6,9$, carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: Varredura sucessiva em $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. D: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. E: I_{pc1} vs v . F: E_{pc1} vs $\log v$, onda lc.

Para o nitroderivado **4**, o voltamograma cíclico é mais complexo, mostrando a presença de duas ondas catódicas denominadas Ic e IIc, e duas ondas anódicas Ia e IIa (Figura 48). A onda Ia está relacionada à Ic, e IIa à IIc, como observado na figura 49 A-B. Uma terceira onda catódica de pequena intensidade aparece entre Ic e IIc, mas não foi investigada. Observou-se através dos gráficos de E_{pc1} e E_{pc2} vs. $\log v$ (Figura 49 E-F), que tanto a onda Ic quanto a IIc apresentaram potenciais de redução dependentes da velocidade de varredura, o que é característico de sistemas irreversíveis.

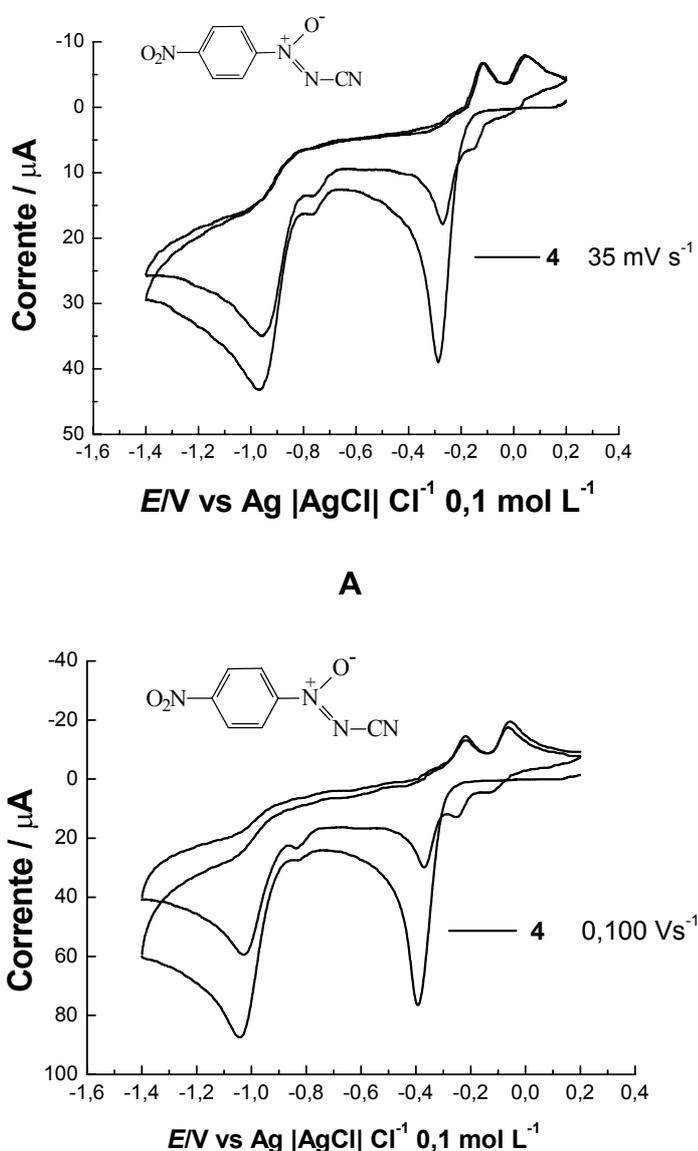


Figura 48. Voltametria cíclica de **4** ($0,001 mol L^{-1}$) em tampão fosfato $0,1 mol L^{-1}$, $pH = 6,9$, carbono vítreo, varreduras sucessivas. A: $v = 0,035 V s^{-1}$. B: $v = 0,100 V s^{-1}$.

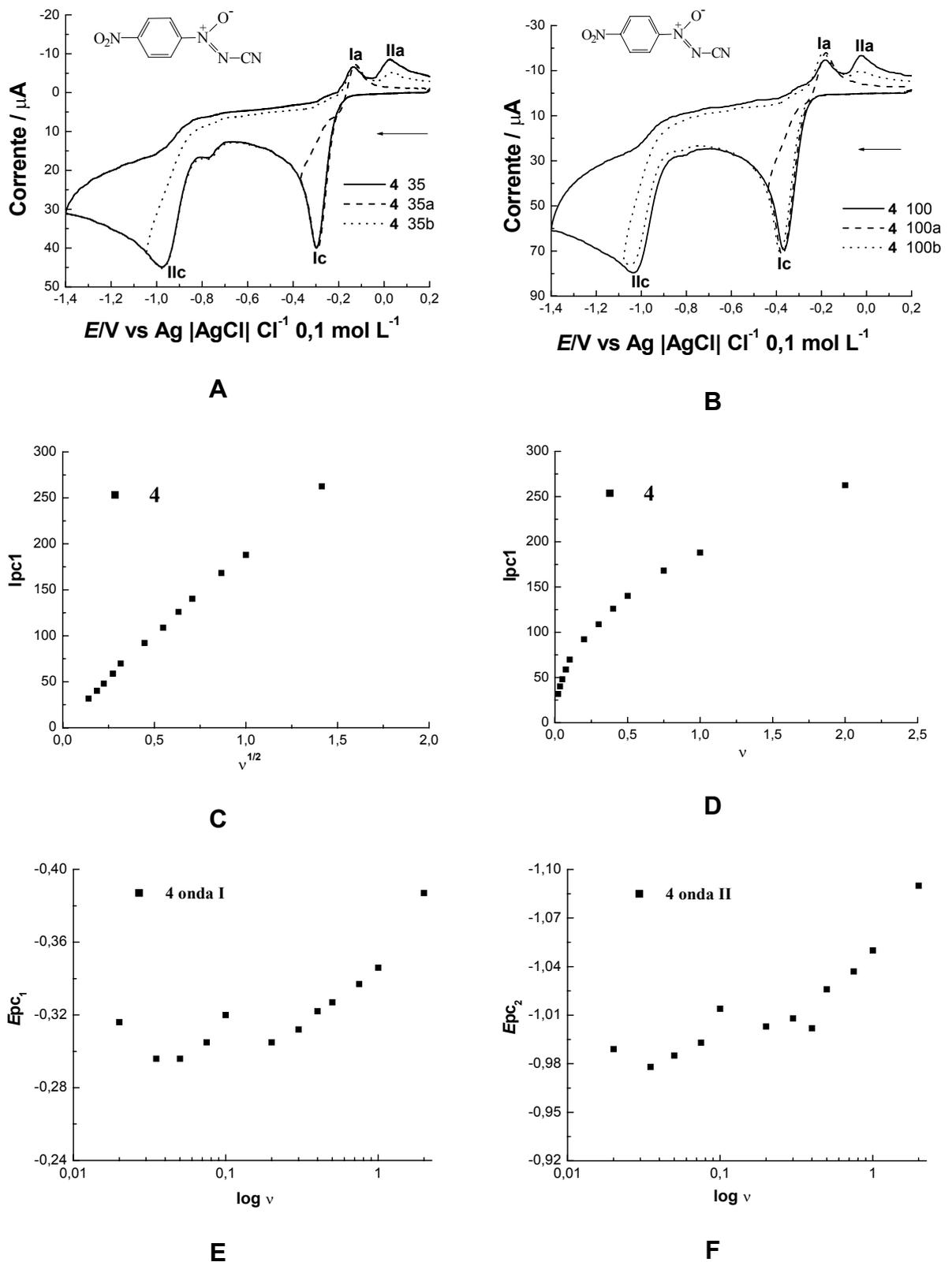
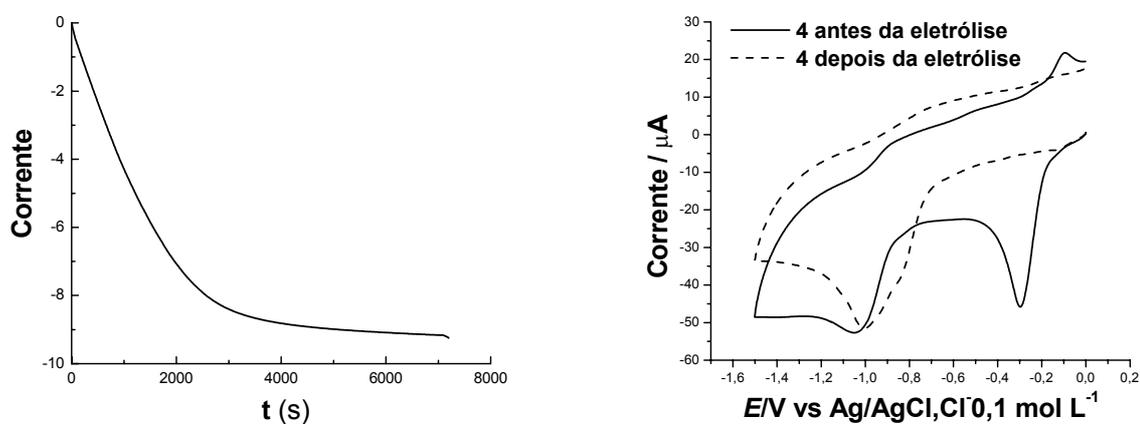


Figura 49. Voltametria cíclica de 4 (0,001 mol L⁻¹) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH = 6,9, carbono vítreo. A: $v = 0,035 \text{ V s}^{-1}$. B: $v = 0,100 \text{ V s}^{-1}$. C: I_{pc1} vs $v^{1/2}$. D: I_{pc1} vs v . E: E_{pc1} vs $\log v$, onda Ic. F: E_{pc2} vs $\log v$, onda IIc.

Determinadas as condições experimentais para a coulometria a potencial controlado do composto **4**, em $E_{ap} = -0,400$ V, registrou-se o número de coulombs gasto, o valor da corrente residual e o tempo do processo. De acordo com a equação de Faraday (página 49) e a carga envolvida no processo, obteve-se o consumo de 3,9 mols equivalentes de elétrons (Figura 50A) e ao completo desaparecimento da primeira onda de redução (Figura 50B).

A primeira onda está relacionada à redução do grupo azoxi ao derivado hidrazo, mais facilmente reduzido do que o grupo substituinte nitro como mostrado anteriormente na literatura⁸³.

Há uma grande diferença de potencial ($\Delta E_p = 0,665$ V) entre a onda Ic ($E_{pc1} = -0,372$ V) relativa à redução do grupo azoxi ao hidrazo, e a onda IIc ($E_{pc2} = -1,037$ V) relativa à redução do grupo nitroaromático hidrazo-substituído. Esta diferença é explicável porque o grupo azoxi que é fortemente eletroatraente foi substituído pelo grupo hidrazo que é eletrodoador, deslocando assim o potencial para valores bem mais negativos.



A **B**
Figura 50. A: Eletrólise do composto 4 em $E_{ap} = -0,400$ V. B: Voltametria cíclica, antes e após a eletrólise.

Com base nos estudos de Tallec⁸³ e Simonet⁸⁰, em meio aquoso tamponado neutro, pode-se propor o mecanismo descrito na figura 51, em etapa única, respectivamente para os compostos azoxi (equações 5-6) e azo (equação 7). A redução do grupo azoxi (onda Ic) ocorre com transferência de quatro elétrons e quatro prótons em uma única etapa, formando o composto hidrazo correspondente. O hidrazo pode ser oxidado por perda de dois elétrons e dois prótons, a um

⁸³ HAZARD, R.; TALLEC, A. *Bull. Soc. Chim. France*, 2917, **1971**.

azocomposto (onda Ia). Ao fazer uma segunda varredura, observa-se o aparecimento de onda de redução adicional, denominada IIc, em potencial mais positivo que a redução do grupo azoxi. Sugere-se que o par de ondas Ia e IIc está relacionado entre si e representa a oxidação do composto hidrazo a azo (onda Ia) e a redução do azocomposto a um hidrazo (onda IIc) (ver Figura 51, equação 7).

Vale a pena ressaltar que o número de prótons transferidos pode variar de acordo com o pH do meio, levando à formação de intermediários reduzidos não protonados, mais facilmente oxidáveis, portanto, em valores mais negativos de potencial.

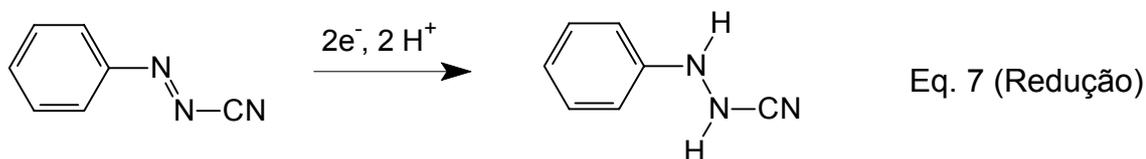
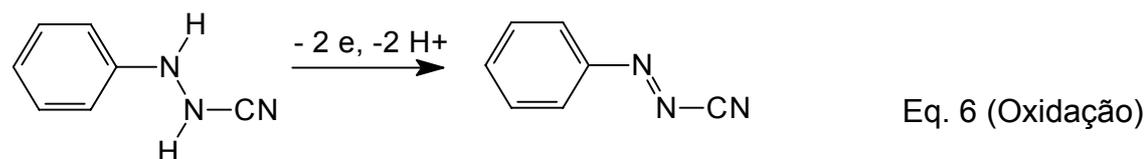
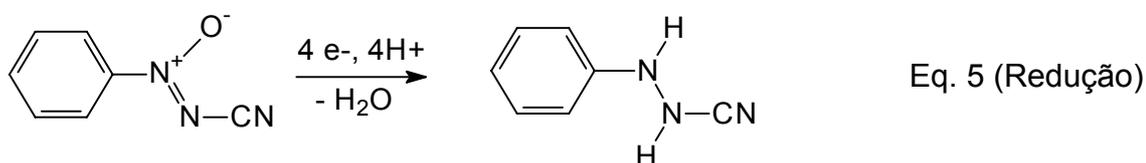


Figura 51. Provável mecanismo para a redução de azoxi- e azocianetos em meio prótico⁷⁵.

Os potenciais de redução (E_{pc1}) dos compostos obtidos por Voltametria Cíclica em meio prótico foram comparados, de acordo com os substituintes no anel aromático, com os valores σ_p e $\sigma_p(\sigma^-)$ de Hammett^{26,76,77,78,79} (Tabela 4, ver gráficos da Figura 52). Calculou-se, com a ajuda do software (Origin 6.0), a melhor reta entre os pontos, obtendo-se os coeficientes de correlação linear (R).

Tabela 4. Principais parâmetros eletroquímicos. Eletrodo de Carbono Vítreo, E_p vs. Ag|AgCl|0,1 mol L⁻¹ Cl⁻, $v = 0,100$ V s⁻¹. Meio prótico. Constantes de Hammett.

Comp.	Meio Aquoso-etanólico, tampão fosfato, pH 6,9		Constantes de Hammett	
	E_{plc}/V	E_{pla}/V	$\sigma_p^{76,77}$	$\sigma_p(\sigma^-)^{a 26,78,79}$
-NO ₂ (4)	-0,372	-0,184	0,78	(1,24)
-CN (3)	-0,386	-0,057	0,71	(0,96)
-Cl (5)	-0,525	-0,208	0,24	(0,227)
-H (2)	-0,560	-0,135	0	0
-CH ₃ (7)	-0,605	-0,198	-0,14	-0,17
-OCH ₃ (6)	-0,629	-0,035	-0,27	-0,268
-N(CH ₃) ₂ (8)	-0,657	—	-0,32	(-0,83)

a) Os valores entre parênteses⁸² são σ^- .

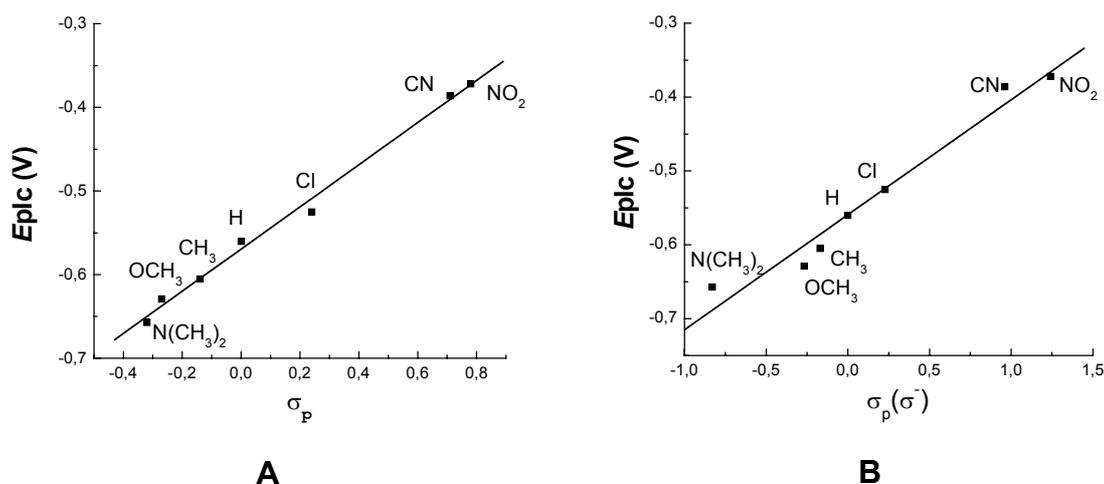


Figura 52. Gráficos de correlação E_{pc1} dos compostos 2-8 vs. constantes de substituinte de Hammett. A: E_{plc} vs. σ_p . B: E_{plc} vs. $\sigma_p(\sigma^-)$.

Para o meio prótico, os gráficos dos dados voltamétricos experimentais de E_{plc} vs σ_p e $\sigma_p(\sigma^-)$ levaram a excelentes correlações lineares com $R = 0,997$ (0,010) (Figura 52 A) e $R = 0,982$ (0,023) (Figura 52 B). Como visto, a melhor reta foi obtida com o valor usual σ_p , levando a seguinte equação: $E_{pc1} = -0,569$ (0,004) + 0,252 (0,009) σ_p . Comparando esses resultados com aqueles do meio aprótico, observamos que em meio prótico, a correlação não foi melhor com os valores de $\sigma_p(\sigma^-)$ e sim com σ_p usual. Explica-se esse comportamento pelo fato de, em meio prótico, devido a alta concentração de prótons, ao ocorrer a redução, ocorre também

a protonação simultânea das espécies eletrogeradas, sendo assim, a possibilidade de haver uma interação ressonante direta entre os substituintes e os intermediários formados após redução (sítio reacional rico em elétrons) é bem menor em meio prótico.

5.1.3 – TENTATIVA DE CORRELAÇÃO DOS PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS COM ATIVIDADES BIOLÓGICAS

A esquistossomose é uma doença parasitária endêmica que afeta as regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. O caramujo *Biomphalaria glabrata* age como hospedeiro intermediário do *S. mansoni*. A redução da transmissão da esquistossomose é fundamental. O uso de moluscidas no tratamento profilático dessa doença promove a ruptura do ciclo evolutivo do helminto, com a destruição do hospedeiro intermediário⁸⁴.

A doença de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, afeta aproximadamente 18 milhões de pessoas no continente americano⁸⁵.

T. cruzi tem uma característica especial em relação ao seu sistema enzimático, que o torna mais vulnerável à ação de geradores de espécies oxigenadas reativas frente a seus hospedeiros biológicos. Seu sistema de defesa redox é baseado em tripanotiona e não em glutaciona, e, adicionalmente, estão ausentes catalase e glutaciona peroxidase⁸⁶.

A despeito do reconhecimento da importância dos cicladores redox em atividades anti-*Trypanosoma*, poucos estudos foram desenvolvidos com a finalidade de estabelecer uma possível correlação entre potenciais redox e atividades tripanossomicidas. No caso das naftoquinonas, sugeriu-se que a facilidade de redução, traduzida por potenciais de redução de primeira onda catódica constituía um parâmetro físico-químico de relevância⁸⁷.

Quanto às atividades moluscidas e tripanossomicidas de azoxicianetos, há um padrão de comportamento: os compostos testados (1-4) são ativos, porém, muito tóxicos.

⁸⁴ PERRETT, S.; WHITFIELD, P. J.. *Parasitol. Today*, **1996** 12, 156.

⁸⁵ URBINA, J.A. *J. Mol. Med.* **1999** 77, 332.

⁸⁶ SCHIRMER, R. H.; MÜLLER, J. G.; KRAUT-SIEGEL, R. L.. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 141.

⁸⁷ GOULART, M. O. F.; FREITAS, L. R.; TONHOLO, J.; DE ABREU, F. C.; RASLAN, D. S.; STARLING, S.; ZANI, C. L.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2043.

Os ensaios tripanossomicidas *in vitro* permitem avaliar a habilidade dos compostos em eliminar as formas tripomastigotas infectantes de *T. cruzi*, variedade Y, presentes no sangue de camundongos infectados experimentalmente. Os compostos, em três diluições, são deixados em contacto com sangue, por 24 horas, a 4 °C, simulando as condições de bancos de sangue. Esse ensaio é usado, normalmente, para avaliar drogas substitutas para a violeta genciana, o primeiro e único agente quimioprolático efetivo em esterilização de sangue destinado a transfusão, que, em concentrações de 0,018 e 0,153 mmol L⁻¹ elimina 50 e 100 % das formas tripomastigotas do sangue contaminado.

A Tabela 5 mostra os resultados dos ensaios tripanossomicidas. O composto 1 não pode ser analisado, devido ao fato de formar emulsões. Comparado à violeta genciana, os compostos podem ser considerados razoavelmente ativos. A atividade tripanossomicida depende da concentração. Os compostos 2 e 7 são os mais ativos da série. Devido aos resultados obtidos nos testes *in vitro*, houve necessidade de experimentos *in vivo*. Os ensaios tripanossomicidas *in vivo* permitem avaliar a habilidade dos compostos em eliminar total ou parcialmente as formas tripomastigotas circulantes ou as teciduais (amastigotas), curando ou aumentando a sobrevivência dos animais infectados, utilizando como padrões positivo e negativo, o benzonidazol e apenas o veículo, respectivamente. Os resultados obtidos evidenciaram que os compostos em análise não foram efetivos na redução da parasitemia, mas, ao contrário, levaram ao seu aumento. Esse fato é devido, provavelmente, à alta toxicidade dos compostos, que diminui a defesa dos organismos. O composto 2 é altamente tóxico, causando a morte de todos os camundongos até o oitavo dia de infecção. Os outros camundongos morreram após 18 dias.

As atividades moluscicidas obtidas para os compostos testados são similares e até superiores às encontradas para vários moluscicidas como o muzigadial, DL₅₀ = 5 a 10 ppm; warburganal, DL₅₀ = 2 ppm, mukaadial, DL₅₀ = 20 ppm⁸⁸, lapachol (DL₉₀ = 4,82 ppm) e isolapachol (DL₉₀ = 2.50 ppm)⁸⁹, embora, menos ativa que a niclosamida DL₉₀ = 0.10 ppm⁹⁰. Em termos da atividade tripanossomicida, os resultados biológicos *in vitro* são apenas razoáveis. A alta toxicidade desses

⁸⁸ MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. *Phytochemistry*, **1985**, 24, 639.

⁸⁹ DOS SANTOS, A.F. *et al. Int. J. Parasitol.* **2000**, 30, 1199.

⁹⁰ ANDREWS, P. *et al. Pharmacol. Ther.*, **1982**, 19, 245.

compostos causa preocupação. Comparativamente aos dados da literatura, em atividades anti-tumorais, o ácido calvático (**1**) mostrou-se ativo, porém menos ativo que **2**, **3** e **4**. A comparação entre os valores de E_{pc1} e as atividades tripanossomicida/moluscicida, apesar do pequeno número de compostos analisados, sugere que os compostos mais eletrofílicos são os mais ativos.

Tabela 5. Atividades biológicas e alguns parâmetros eletroquímicos

	Atividade Moluscicida			Ensaio tripanossomicida <i>in vitro</i> [redução da parasitemia (%)]			Potenciais redox	
	DL ₁₀ ppm	DL ₅₀ ppm	DL ₉₀ ppm	100µg/mL (mmol L ⁻¹)	50µg/mL (mmol L ⁻¹)	25µg/mL (mmol L ⁻¹)	E_{pc1} (V)***	E_{pc1} (V)****
CO ₂ H (1)	1,58	3,33	6,99	*	*	*		
-H (2)	1,77	2,38	3,19	98 (0,680)	45 (0,340)	18 (0,170)	-0,607	-0,560
-Cl (5)	1,00	1,17	1,36	97 (0,552)	29 (0,276)	3.2 (0,138)	-0,541	-0,525
-CH ₃ (7)	1,14	1,79	2,79	97 (0,621)	43 (0,311)	13.6 (0,155)	-0,676	-0,605

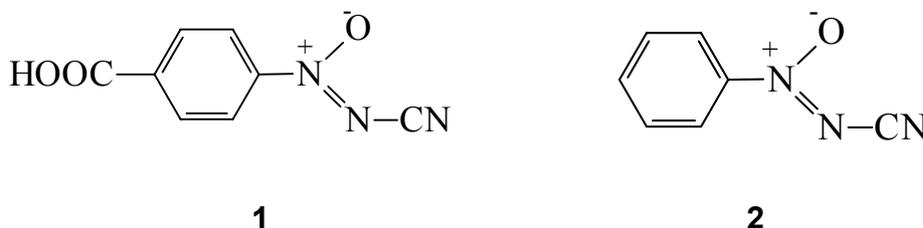
*O composto 1 forma emulsão na presença de DMSO. **Os testes apurados não foram realizados. ***DMF/TBAP 0,1 mol L⁻¹, CV, E vs. Ag/AgCl, Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹). ****Tampão fosfato/etanol, pH 6,9, CV, E vs. Ag/AgCl, Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹).

Ensaio *in vitro* de atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, e contra fungos, realizadas com os compostos **2**, **4**, **5**, **6** e **8**, mostraram que alguns compostos são muito tóxicos, na dose de 100mg/Kg tiveram 100% de mortalidade. Comparando-se com os potenciais de redução não obteve-se uma correlação direta com a atividade.

Tabela 6. Comparação entre potenciais de redução e atividade antimicrobiana.

	H	p-Cl	p-NO ₂	p-OCH ₃	p-N(CH ₃) ₂
E_{pc1} em meio aprótico	-0,607	-0,541	-0,311	-0,716	-0,905
E_{pc1} em meio prótico	-0,560	-0,525	-0,372	-0,629	-0,657
Test microorganisms					
<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	3,1	6,2	100	12,5	> 100
<i>Staphylococcus aureus</i> 153	12,5	6,2	> 100	25	> 100
<i>Sarcina lutea</i>	6,2	12,5	100	50	> 100
<i>Bacillus subtilis</i>	3,1	12,5	100	25	> 100
<i>Escherichia coli</i> B	12,5	25	> 100	50	> 100
<i>Salmonella abortus equi</i>	3,1	25	100	50	> 100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,5	25	> 100	50	> 100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,1	25	> 100	100	> 100
<i>Mycobacterium smegmatis</i> 607	0,7	3,1	25	12,5	> 100
<i>Candida albicans</i>	1,5	6,2	100	12,5	> 100
<i>Epidermophyton floccosum</i> b	-	3,1	3,1	0,19	50
<i>Aspergillus niger</i>	0,6	3,1	> 100	12,5	50

5.2 – ESTUDO DA VARIAÇÃO DO POTENCIAL DE REDUÇÃO COM O pH E CURVAS ELETROANALÍTICAS DO ÁCIDO CALVÁTICO (1) E SEU ANÁLOGO (2).



O pH pode afetar o comportamento eletroquímico de vários compostos, causando mudanças nos potenciais redox, nas correntes de pico e até no mecanismo eletroquímico. O estudo da variação dos potenciais redox em função do pH, permite, em alguns casos, a obtenção dos valores de pKa, o coeficiente de dissociação, que descreve a extensão da dissociação de grupos funcionais. O pKa é uma das principais propriedades físico-químicas de moléculas capazes de alterar seu perfil farmacoterapêutico, sendo esse parâmetro, de grande importância em algumas áreas da Química Medicinal, como o descobrimento e desenvolvimento de fármacos, onde o conhecimento do estado de dissociação de um grupo funcional é, muitas vezes, vital para entender as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de novos fármacos⁹¹. Adicionalmente, a protonação é uma etapa fundamental para a atividade biológica de derivados imínicos. Azoxiaromáticos pertencem à grande classe dos sais de imínio.

Desenvolveu-se, pois, o estudo da variação do potencial de redução de **1** e **2** com o pH (Figuras 53 e 54), utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), com o uso de eletrodo de carbono vítreo, platina e Ag/AgCl, Cl⁻ (0,1 mol/L), como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente.

O gráfico da figura 53 mostra as várias curvas de VPD obtidas para o ácido calvático em 14 valores de pH, variando entre 1,20 e 12,04. Observa-se no gráfico que tanto as correntes de pico como os potenciais de redução sofreram grandes mudanças. Mantendo-se a concentração de **1** constante (1×10^{-3} mol L⁻¹), obteve-se um gráfico da variação do potencial catódico (ΔE_{pc}) versus pH (Figura 54 B), que apresentou comportamento não linear e mecanismo complexo. A análise da variação

⁹¹ AVDEEF, A., *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, 20, 631.

da corrente (i_p) com o pH evidencia uma ampla variação da corrente em pH ácido, com maiores valores sendo obtidos com a diminuição do pH. Nos valores de pH no intervalo entre 4 e 8, a corrente fica praticamente constante. Em valores de pH mais elevados, observa-se a alteração das correntes para valores mais baixos (Figura 54A).

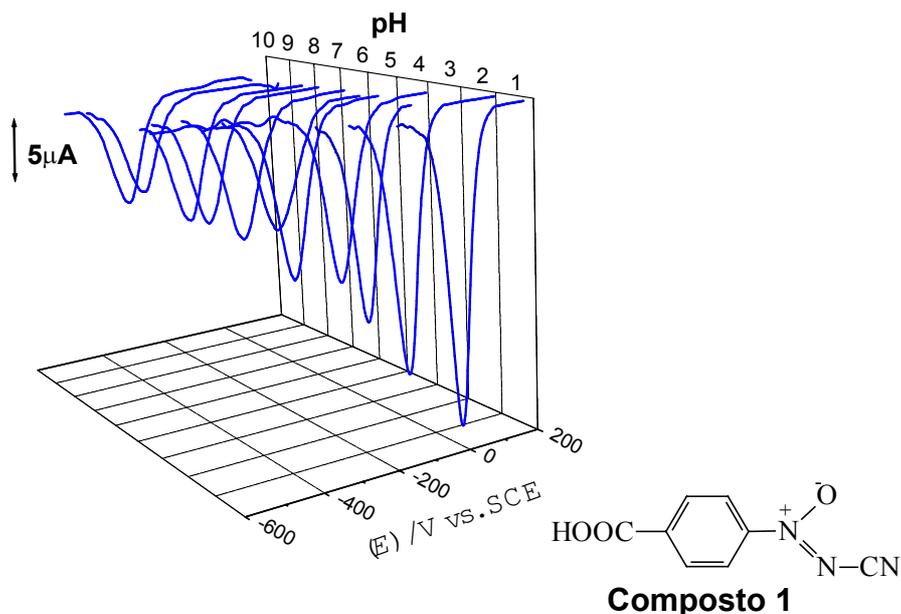


Figura 53. Gráfico de i_p vs. E_p vs. pH obtido pela técnica de Voltametria de Pulso Diferencial para o Ácido Calvático ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$); meio aquoso tamponado com 20% de etanol, amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

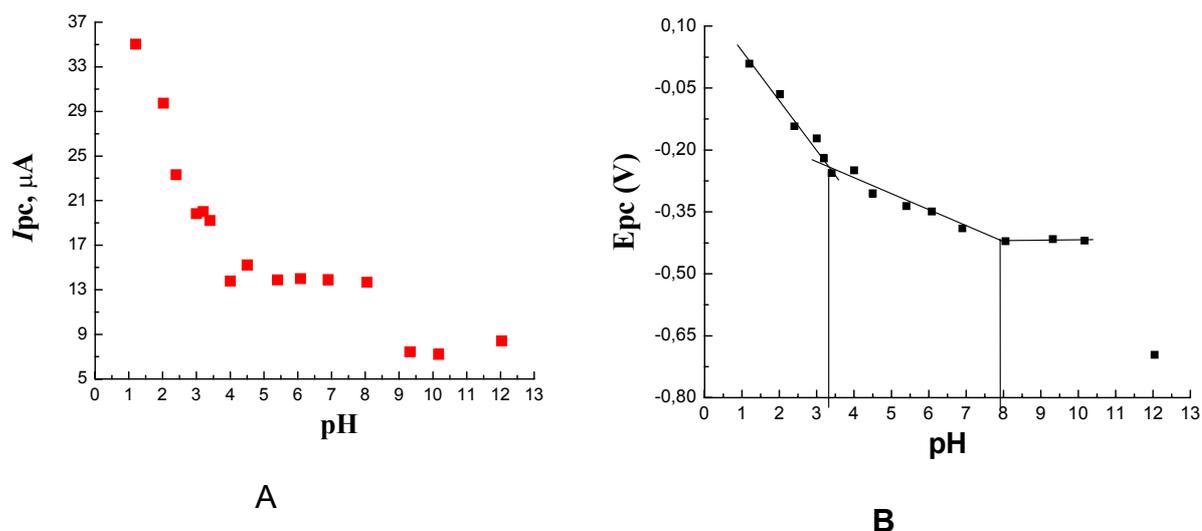
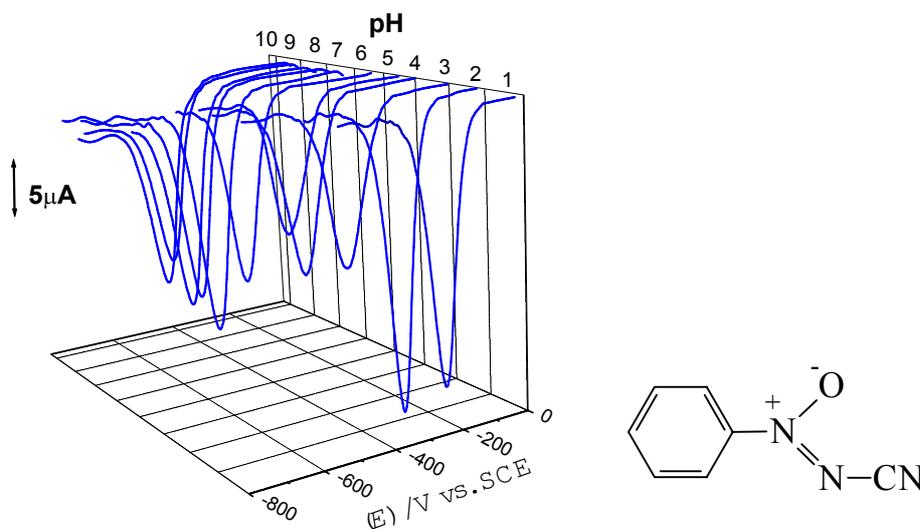


Figura 54. A: Gráfico de I_p vs. pH. B: Gráficos de E_p vs. pH para os picos da VPD correspondentes à redução de **1. Obtenção dos pK_{a1} e pK_{a2} para **1**. Amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.**

O gráfico B da figura 54 mostra três regiões distintas de comportamento. Observa-se o deslocamento do potencial para valores mais negativos com o aumento do pH. O meio mais ácido leva à protonação das espécies, que, então, sofrem redução mais facilmente. Em meio muito alcalino, há degradação de **1**. Na primeira faixa, em pH baixo (1,2 – 3,0) obteve-se uma reta com inclinação de 117 mV/unidade de pH. A faixa de pH entre 4,0 e 8,05 apresentou uma reta com inclinação de 38 mV/unidade de pH. Entre os pH 8,05 e 10,19 os potenciais de redução são praticamente independentes do pH.

Em meio mais alcalino, houve variação de E_p e I_p , para valores mais negativos e menores, respectivamente.

Com **2**, também foram executados experimentos em valores de pH variando entre 1,20 e 12,04. A figura 55 mostra os voltamogramas obtidos por VPD, nos respectivos valores de pH. Observa-se no gráfico que as correntes de pico seguiram um comportamento irregular, sofrendo grandes variações com a mudança do pH. Já os potenciais de redução tiveram um comportamento mais regular com a mudança do pH.



Composto 2

Figura 55. Gráfico de I_p vs. E_p vs. pH obtido pela técnica de Voltametria de Pulso Diferencial para o composto **2** ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$); meio aquoso tamponado com 20% de etanol, amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.

Utilizou-se uma mesma concentração de **2** ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e obteve-se um gráfico que mostra a variação do potencial catódico (ΔE_{pc}) vs pH (Figura 56), com comportamento não linear e com duas regiões distintas. Observa-se o deslocamento do potencial para valores mais negativos com o aumento do pH, o que indica maior dificuldade de redução, em valores de pH mais altos. O meio mais ácido leva à protonação das espécies, que, então, sofrem redução mais facilmente.

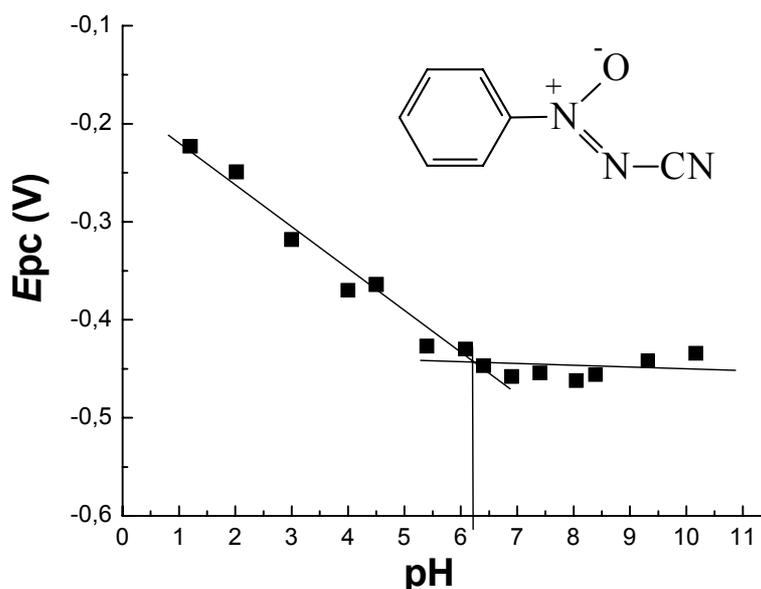


Figura 56. Gráfico de E_p vs. pH para os picos da VPD correspondentes à redução de **2**.

Na primeira faixa, em pH ácido a neutro (1,2-6,9) obteve-se uma reta com inclinação de 42 mV/unidade de pH cuja equação é representada por: $E_p = -0,179 - 0,042 \text{ pH}$. Acima de pH 6, o valor de E_p mostrou-se praticamente independente do pH.

A relação entre o número de prótons e de elétrons foi obtida pela seguinte equação:

$$\Delta E_p = (0,059 \times Z_{H^+} / n\alpha) \times \Delta \text{pH}$$

Onde:

Z_{H^+} = número de prótons transferidos

n = número de elétrons

α = coeficiente de transferência eletrônica

O mecanismo de redução de **1** é complexo (**Figura 57 A**)^{80,83}. Em meio ácido forte, o consumo de prótons é similar ao de elétrons. Considerando $\alpha = 0,5$, temos o valor de $Z_{H^+}/n = 0,992$. Há redução e quebra da ligação hidrazo (**Figura 57 A**). Em meio ácido fraco a neutro, onde a razão $Z_{H^+}/n = 0,334$ (para $\alpha = 0,5$) há formação de produtos de redução intermediários (**Figura 57 A**). As reações de protonação são lentas, daí a diferença entre e^- e H^+ transferidos. Observa-se que em pH acima de 8, a redução de **1** ocorre em potenciais muito próximos. Conforme dados da

literatura⁸³, em meio muito alcalino pode ocorrer hidrólise básica do grupo azoxiciano, formando o sal correspondente de acordo com a Figura 57B. O sal, uma vez formado, é mais facilmente reduzido do que o composto azoxi original (Figura 57B). Foi possível estabelecer dois valores de pKa aparente para **1**, pKa₁ = 3,3 e pKa₂ = 7,9, através do encontro das retas nas diferentes regiões do gráfico de *E_p* vs. pH; O pKa₁ (3,3) refere-se à dissociação do grupo ácido de **1** e foi similar ao registrado na literatura por outras técnicas (3,2)⁵¹. O pKa₂ (7,9) refere-se a protonação/desprotonação do grupo azoxi (**Figura 57 C**).

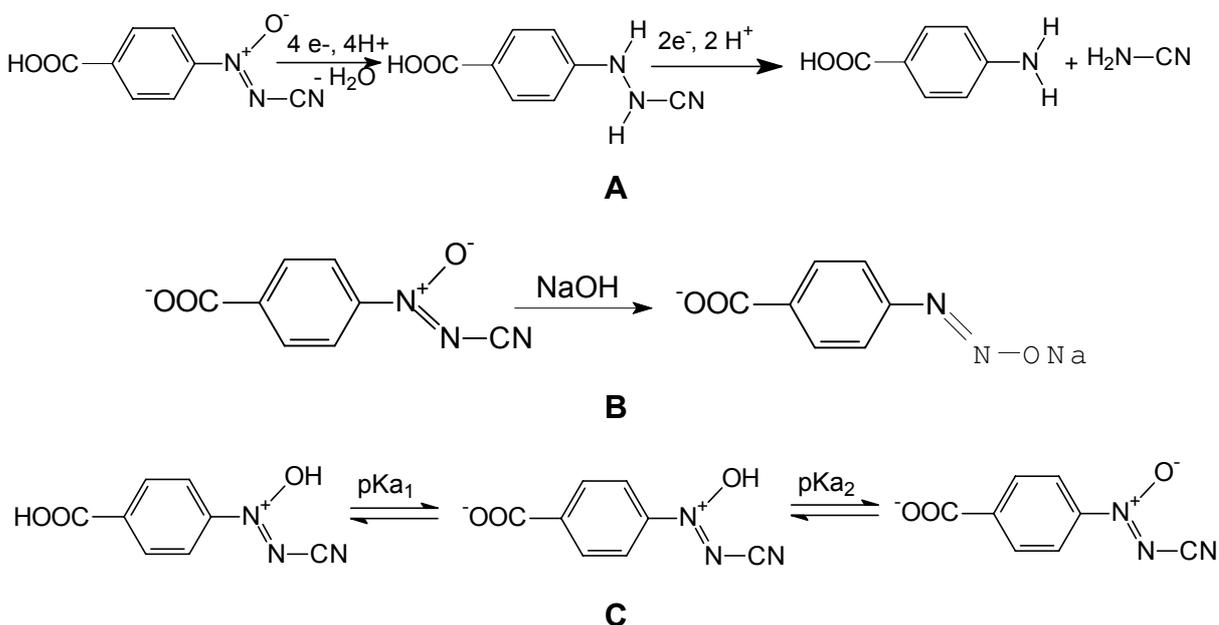


Figura 57. A: Mecanismo provável de redução do Ácido Calvático em meio ácido – pH baixo. B: Exemplo de hidrólise básica que pode ocorrer com **1 em meio alcalino⁹². C: Representação da dissociação do Ácido Calvático (**1**).**

Em meio aquoso, o mecanismo de redução de **2** mostra-se fortemente dependente do pH e é muito complexo. Em meio ácido a neutro, o consumo de prótons é de cerca de 1/3 do de elétrons. Assim, para $\alpha = 0,5$, temos o valor de $Z_{H^+}/n = 0,356$. Observa-se que em pH acima de 6, os potenciais de redução de **2** permanecem praticamente constantes, e com valores mais positivos do que os anteriores. Foi possível estabelecer o valor de pKa para **2** (6,2) similar ao da literatura obtido por outras técnicas⁹³ através do encontro entre as duas retas do gráfico de *E_p* vs. pH (Figura 58). Esse pKa refere-se a dissociação do grupo azoxi.

⁹² FRUTTERO, R.; *et al. Anticancer Res.* **1989**, *9*, 971-972.

⁹³ CHUANG, L. FRIED, I.; ELVING, P. *J. Anal. Chem.* **1965**, *37*, 1528.

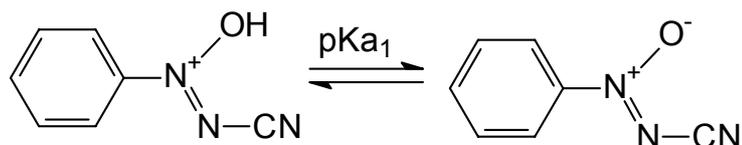


Figura 58. Representação da dissociação do composto 2, $pK_{a1} = 6,2$.

O ácido calvático apresenta forte interesse farmacológico e sua quantificação em meios biológicos/outros é de interesse. São poucos os trabalhos relativos à sua quantificação, daí, o nosso interesse analítico. Escolheu-se o pH 6,9, devido à similaridade com o pH em meio biológico, assim como pela maior regularidade do processo eletroquímico. A análise do efeito da concentração na corrente de $E_{p,c1}$ mostrou linearidade entre a corrente de pico e a concentração (Figura 59). Evidenciou-se linearidade entre a corrente de pico e a concentração, em c_1 entre 5×10^{-3} a 5×10^{-5} mol L⁻¹, descrita pela equação $I_{p,a}$ (A) = 1,046 + 1,035 ([C]/M) (R = 0,9967, n = 11).

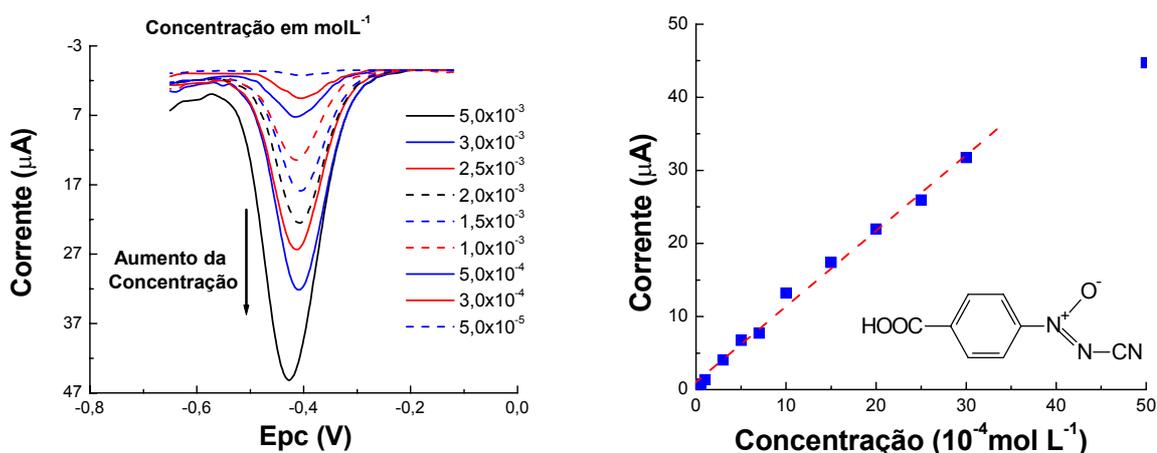


Figura 59. A: VPD de 1 para várias concentrações, 0,1 mol L⁻¹, tampão fosfato, pH 6,9. Amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $v = 5$ mVs⁻¹. B: Análise da corrente de $E_{p,c1}$ versus concentração de 1.

A análise do efeito da concentração de 2 na corrente de $E_{p,c1}$ mostrou linearidade entre a corrente de pico e a concentração (Figura 60). Evidenciou-se linearidade entre a corrente de pico e a concentração, em c_2 entre $3 \cdot 10^{-3}$ a $1 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹, descrita pela equação $I_{p,a}$ (A) = 3,493 + 1,700 ([C]/M) (R = 0,9922, n = 11).

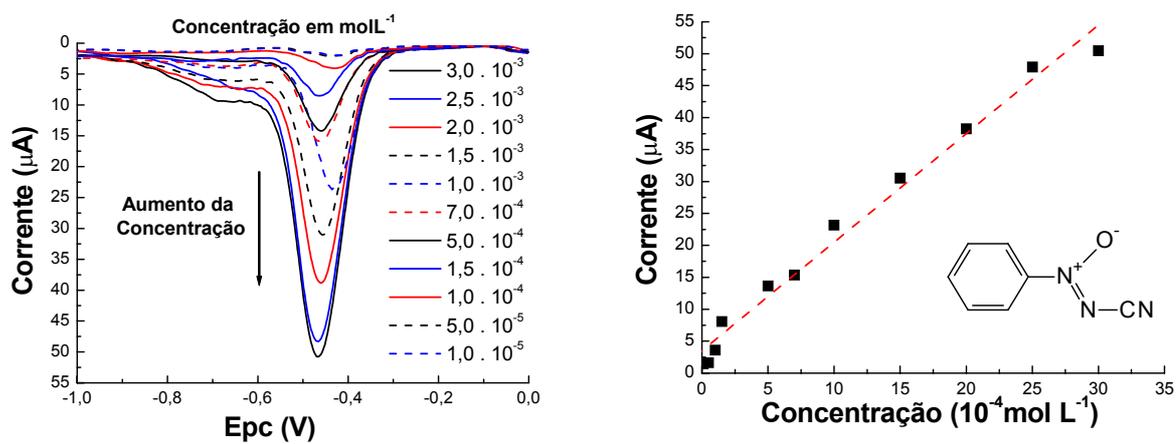


Figura 60. A: VPD de 2 para várias concentrações (mol L^{-1}), tampão fosfato, pH 6,9. Amplitude de pulso: 50 mV, tempo de pulso: 70 ms, $\nu = 5 \text{ mVs}^{-1}$. B: Análise da corrente de Epc versus concentração de 2.

5.3 – COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DETALHADO DA REDUÇÃO DO ÁCIDO CALVÁTICO EM MEIO PRÓTICO

O comportamento eletroquímico do ácido calvático (**1**) em meio misto, tampão acetato-etanol (8:2), apresentou mecanismos diferenciados de acordo com o pH. No item 5.2, a variação de o potencial de redução em relação ao pH, via utilização de VPD, foi analisada, com determinação do pKa (pg. 94).

A utilização da voltametria cíclica levou aos resultados mostrados na figura 61, com pequenas diferenças. Em pH 1,2, o voltamograma o voltamograma cíclico de **1** apresentou uma única e intensa onda catódica, denominada I_c , de natureza irreversível (E_{pc1} dependente da velocidade de varredura), seguida de uma onda anódica menos intensa, denominada I_a , no ciclo reverso. Em voltametria de onda quadrada observou-se que a onda catódica I_c não apresenta a componente da varredura reversa, o que confirma a sua irreversibilidade (Figura 61).

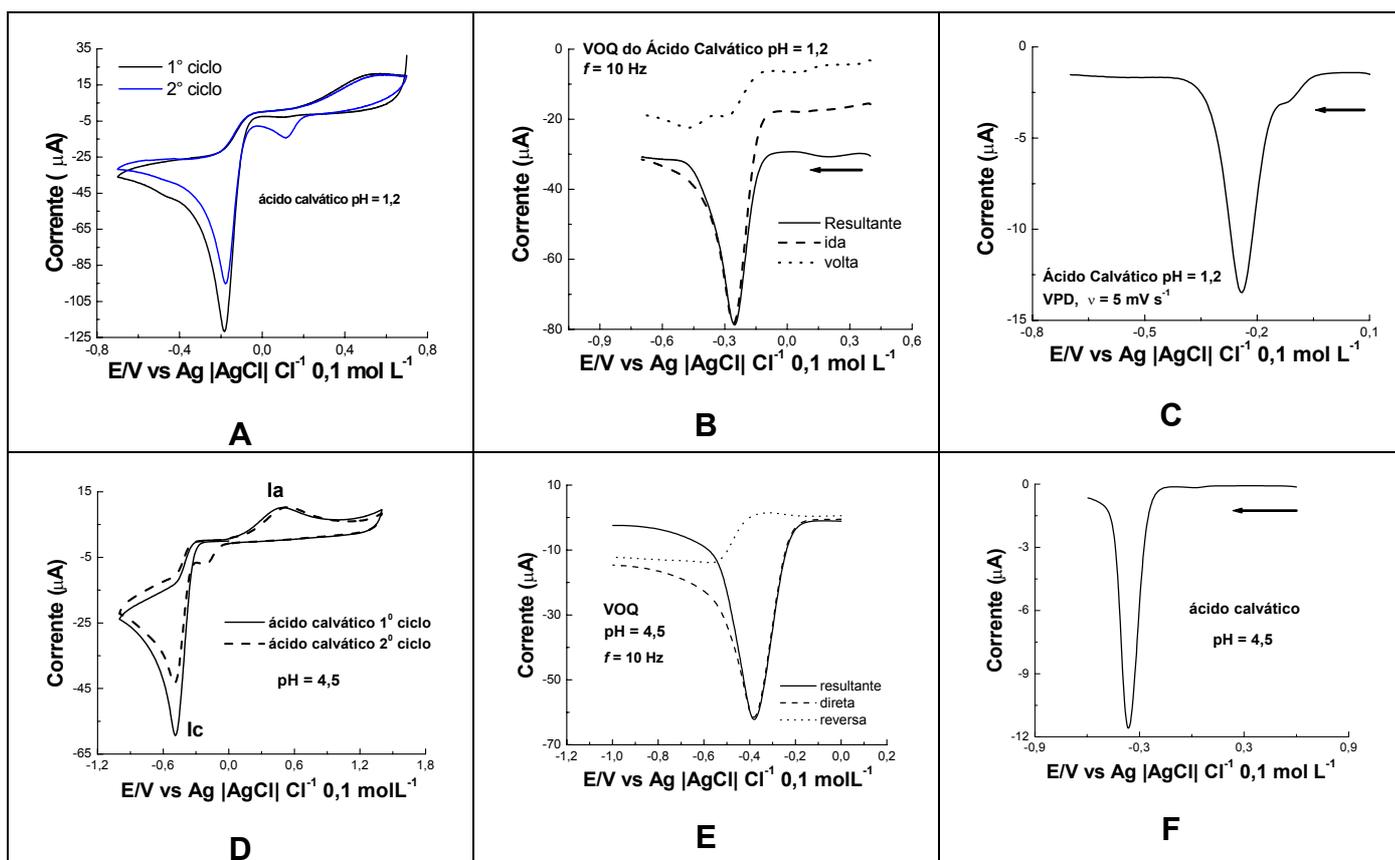


Figura 61. Ácido Calvático ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em meio prático tamponado, eletrodo de carbono vítreo. A: VC em pH = 1,2, $\nu = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$; B: VOQ em pH = 1,2, $f = 10 \text{ Hz}$; C: VPD em pH = 1,2, $\nu = 0,005 \text{ Vs}^{-1}$; D: VC em pH = 4,5, $\nu = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$; E: VOQ em pH = 4,5, $f = 10 \text{ Hz}$; F: VPD em pH = 4,5, $\nu = 0,005 \text{ Vs}^{-1}$.

O mecanismo envolvido nesse meio já foi discutido e está representado pela Figura 62. Em meio ácido forte, sugere-se o consumo de seis elétrons e seis prótons na redução e quebra da ligação hidrazo formando os derivados correspondentes. Visto que, foi utilizada a mesma concentração do ácido calvático em ambos os pH (0,001 mol L⁻¹), isso explica o aumento da altura de corrente do pH = 1,2 em relação ao pH = 4,5, que, por sua vez, sofre redução apenas até o derivado hidrazo envolvendo quatro elétrons e quatro prótons (ver figura 63). Observa-se também uma maior facilidade de redução em pH = 1,2, devido à concentração de prótons no meio ser mais alta, deslocando, assim, o potencial de redução para valores mais positivos.

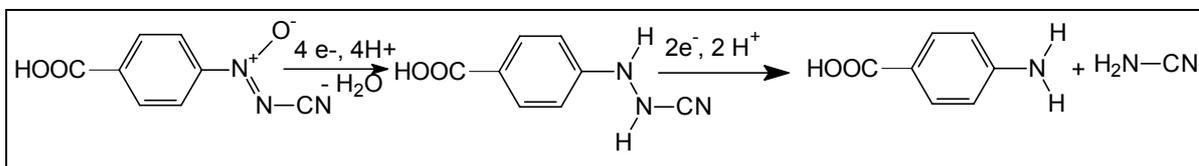


Figura 62. Mecanismo provável de redução do Ácido Calvático em meio ácido.

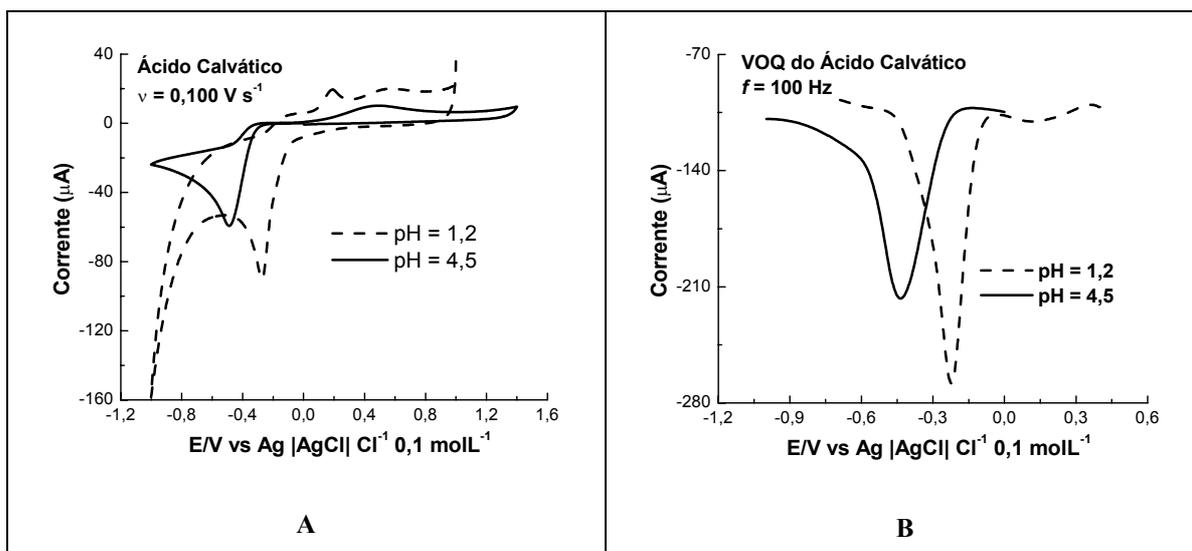


Figura 63. Ácido Calvático (0,001 mol L⁻¹) em meio prótico tamponado, pH = 1,2 e 4,5, eletrodo de carbono vítreo. A: VC em $v = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$; B: VOQ em $f = 100\text{Hz}$.

O Ácido Calvático em pH = 5,6 apresentou comportamento similar ao pH = 4,5, com exceção apenas na técnica de voltametria de onda quadrada (Figura 64A-B).

Na curva de VOQ, observa-se o aparecimento de uma onda na varredura reversa, com intensidade bem menor do que a onda da varredura direta; demonstrando, assim, uma pequena reversibilidade no sistema. Esse

comportamento é um pouco parecido com a curva de VOQ em $\text{pH} = 6,9$ (Figura 65B), a qual apresenta um sistema reversível bem evidente. Essa pequena reversibilidade em $\text{pH} = 5,6$ não foi observada na curva de voltametria cíclica, onde a onda catódica I_c não tem correspondente anódica e tem o potencial de redução dependente da velocidade de varredura (Figura 64C), característica, essa, atribuída a sistemas irreversíveis.

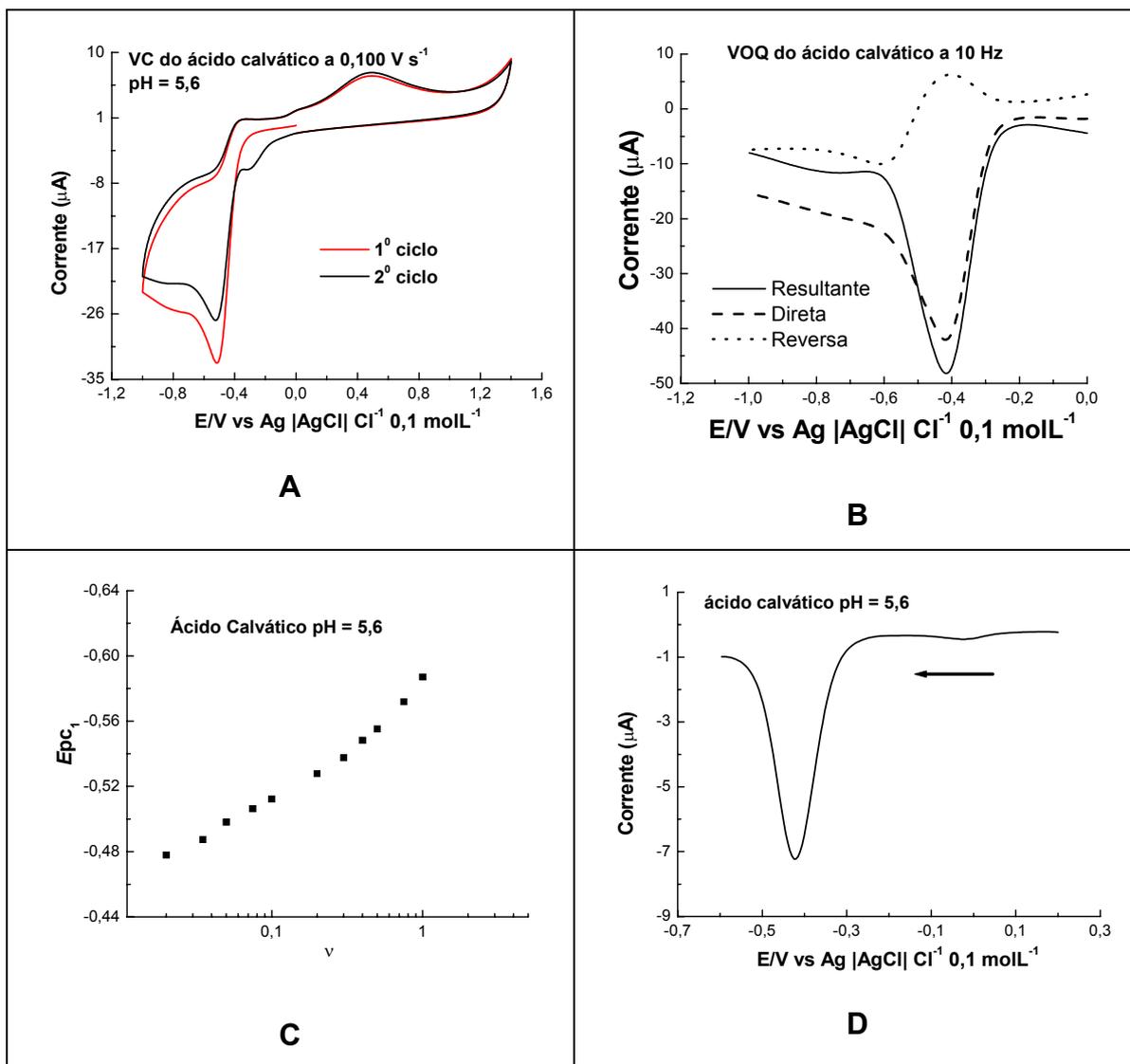


Figura 64. Ácido Calvático ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico tamponado (tampão fosfato), $\text{pH} = 5,6$, eletrodo de carbono vítreo. A: VC em $\nu = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$; B: VOQ em $f = 100 \text{ Hz}$. C: Gráfico de E_{pc_1} vs. ν . D: VPD em $\nu = 0,005 \text{ Vs}^{-1}$.

Em $\text{pH} = 6,9$, o voltamograma cíclico do ácido calvático apresentou duas ondas catódicas denominadas I_c e II_c (figura 65A). A onda catódica I_c tem a correspondente onda anódica I_a e o potencial de I_c independe da velocidade de

varredura (Figura 65C), caracterizando um sistema reversível, o que foi confirmado com a voltametria de onda quadrada (figura 65B). Nessa técnica observa-se, para a primeira onda catódica I_c , uma onda na varredura reversa de intensidade semelhante à onda da varredura direta, o que é típico de sistemas reversíveis. Sugere-se que essa onda I_c corresponda à formação de um ânion radical estável nesse pH, que é formado após a captura de um elétron pelo grupo azoxi. Em meio aquoso, em pH próximo a sete, não é muito comum esse tipo de comportamento. Compostos que apresentam, nesse meio, a formação reversível de um ânion-radical estável, são de grande importância porque podem ser utilizados como mediadores em reações de redução que aconteçam em potenciais mais negativos.

O Ácido Calvático, em todos esses pH estudados, não apresentou onda de oxidação na varredura anódica de 0 a 1,4 V (Ver VPD na Figura 65D).

Foram realizados experimentos adicionais com o Ácido Calvático, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, em pH = 4,5; com o intuito de obter informações sobre o seu comportamento nesse pH, em razão de estudos posteriores do Ácido Calvático em biossensor de DNA, a ser realizado nesse pH = 4,5. Esse pH foi escolhido de acordo com a literatura, por ser um dos mais indicados para se trabalhar com *dsDNA* (fita dupla), devido à sua estabilidade nesse meio, evitando uma possível desnaturação da fita dupla do DNA e conseqüente exposição das bases.

O mecanismo de redução do grupo azoxi já foi discutido anteriormente e envolve o consumo de 4 elétrons / 4 prótons, levando a formação do derivado hidrazo; esse por sua vez pode ser oxidado ao azocomposto correspondente formando um par redox reversível. Na primeira varredura de VPD observa-se uma onda de redução (I_c) relativa a esse mecanismo. Ao fazer varreduras sucessivas, a partir da segunda varredura aparece uma segunda onda de redução, denominada I_{lc} , equivalente a redução do azocomposto formado na primeira varredura. Os voltamogramas sucessivos mostraram um decréscimo da corrente de pico correspondente ao grupo azoxi, I_c , e um aumento do pico de redução do derivado azo, I_{lc} , Figura 66A, que não mais variam já a partir da segunda varredura. Esse comportamento é explicado pela redução do ácido calvático levando ao seu consumo na superfície do eletrodo e eletrogerando o derivado hidrazo, que se acumula na superfície e é reversivelmente oxidado ao azocomposto.

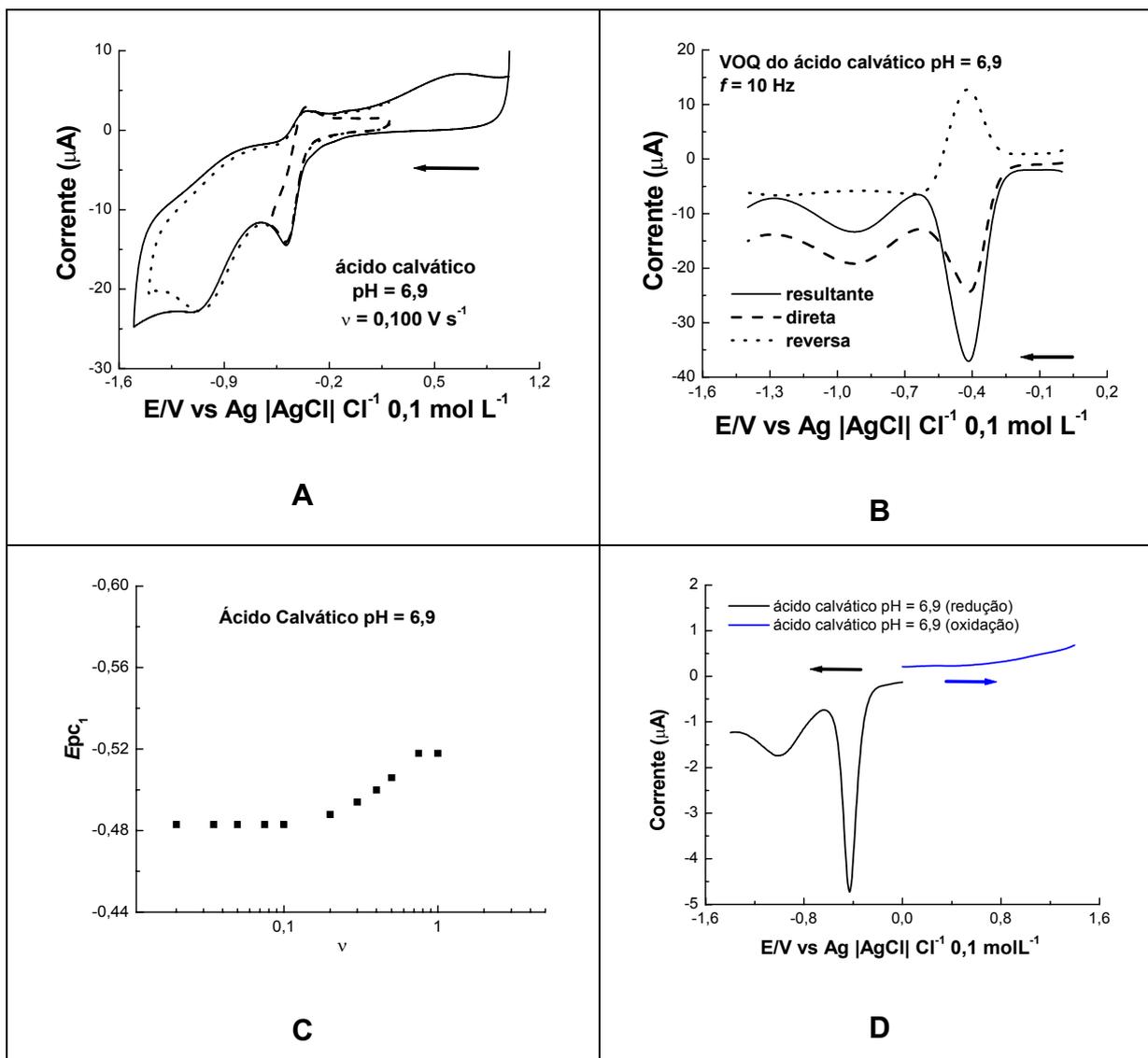


Figura 65. Ácido Calvático ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em meio prótico tamponado (tampão fosfato), pH = 6,9, eletrodo de carbono vítreo. A: VC em $v = 0,100 \text{ Vs}^{-1}$; B: VOQ em $f = 10 \text{ Hz}$. C: Gráfico de E_{pc_1} vs. v . D: VPD em $v = 0,005 \text{ Vs}^{-1}$.

O voltamograma de pulso diferencial para a oxidação do ácido calvático na faixa de potencial de 0 a +1,4 V não apresentou nenhuma onda de oxidação (Figura 66b). No entanto, ao fazer a varredura do sentido catódico para o anódico, iniciando em $-0,600 \text{ V}$ (Figura 66C), observa-se a onda de oxidação do derivado hidrazo eletrogerado na redução de 1, IIa, ($E_{pa} = +0,079 \text{ V}$). Fizeram-se varreduras sucessivas iniciando em $-0,400 \text{ V}$, mas a corrente da onda IIa não aumentou (Figura 66D).

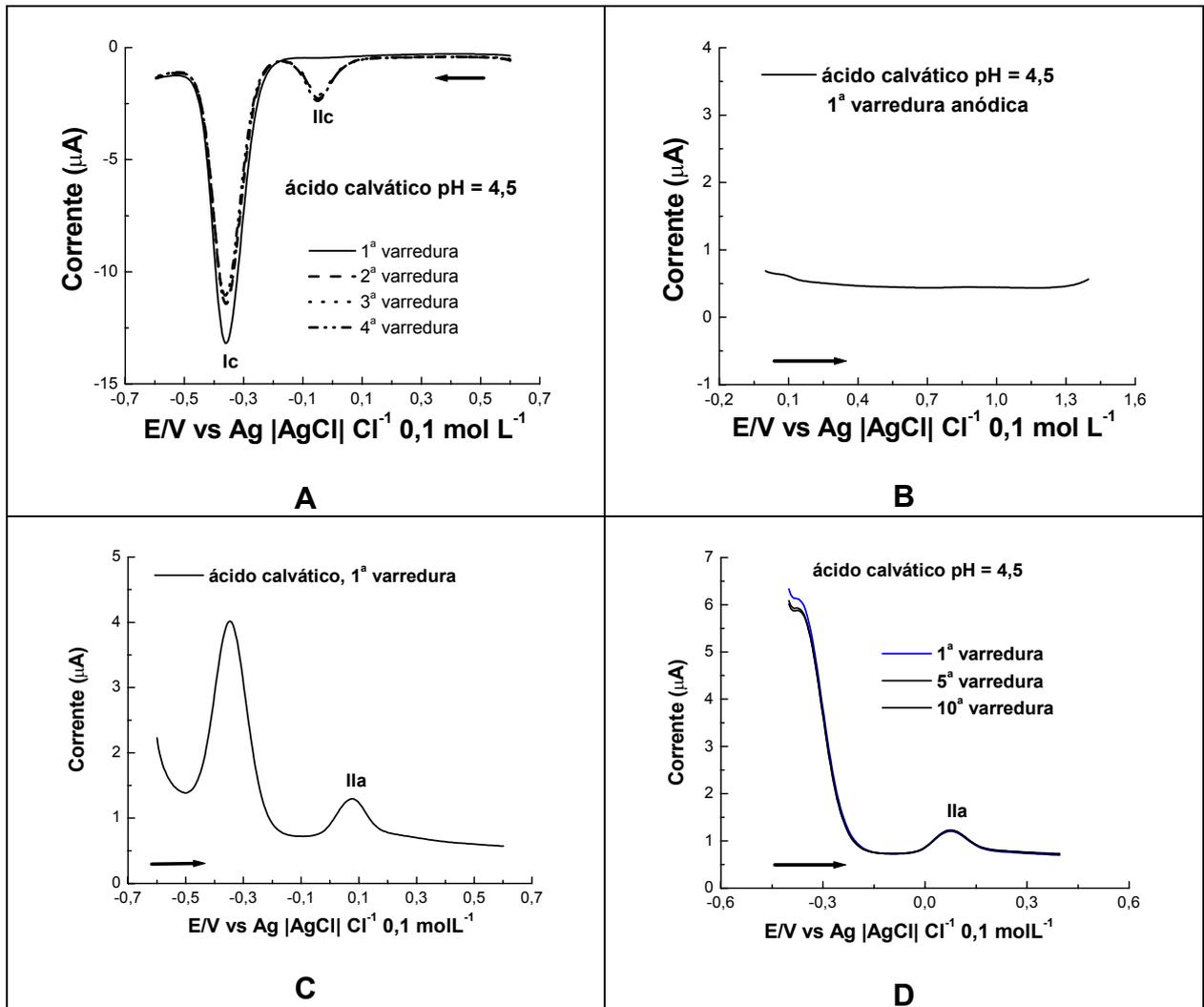
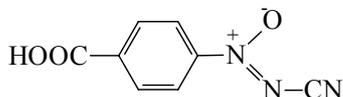
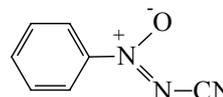


Figura 66. VPD do Ácido Calvático ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$) em meio aquoso-etanólico (8:2) tamponado (tampão acetato), pH = 4,5, eletrodo de carbono vítreo, $\nu = 0,005 \text{ Vs}^{-1}$. A: Varreduras sucessivas de +0,600 V a -0,600 V. B: Varredura na faixa positiva de 0 a +1,400 V. C: Varredura na direção positiva de -0,600 V a +0,600 V. D: Varredura na direção positiva de -0,400 V a +0,400 V.

5.4 – ESTUDO ELETROQUÍMICO DO ÁCIDO CALVÁTICO (1) E DE 2 EM BIOSENSOR DE *dsDNA*.

**1****2**

Após a preparação do biossensor de *dsDNA* (fita dupla), foram realizadas varreduras em voltametria de pulso diferencial na faixa de 0 a +1,400 V com o biossensor imerso em uma solução de tampão acetato, pH = 4,5. Esse tratamento é útil para fixar o *dsDNA* na superfície eletrodica, por atração eletrostática entre as cargas positivas geradas e as funções fosfato ligadas à desoxiribose, que possuem cargas negativas. Nessa situação, para evitar resultados duvidosos, causados, p. ex., por desnaturação parcial do *dsDNA*, o processo deve ser sempre acompanhado por um biossensor-branco de *dsDNA*, confeccionado de maneira idêntica e submetido aos mesmos tratamentos que o biossensor analítico. A quantidade de *dsDNA* adicionada é ideal para cobrir toda a superfície eletrodica, impedindo a oxidação direta do analito. Um outro procedimento, também, muito útil, embora, menos utilizado na presente tese, consiste em imergir o biossensor de *dsDNA* confeccionado acima, em uma solução de *ssDNA* (fita simples, desnaturado). Ambos os biossensores são analisados por VPD, para efeitos de comparação, em ausência e presença do analito.

O espectro eletroquímico do biossensor de *dsDNA* imerso na solução do tampão acetato (pH=4,5) não mostrou qualquer evidência de oxidação de bases como mostrado na figura 67, isto porque o *dsDNA* está na superfície do eletrodo na forma de dupla hélice e as suas bases, passíveis de oxidação, não estão disponíveis devido às ligações de hidrogênio entre as bases nas fitas de *dsDNA*. Ao colocá-lo em uma solução contendo *ssDNA* (desnaturado) observou-se, claramente, a presença de dois picos de oxidação a +0,880 V e a +1,214 V vs. Ag/AgCl, Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹) referentes à oxidação das bases Guanina e Adenina, respectivamente. Isto acontece porque ao colocar a solução de *ssDNA* (desnaturado), a fita simples da molécula de DNA adsorve na dupla hélice do *dsDNA* que está adsorvido na

superfície do eletrodo e é chamada, agora, de DNA de hélice tripla. As bases no ssDNA estão expostas e disponíveis para sofrerem oxidação.

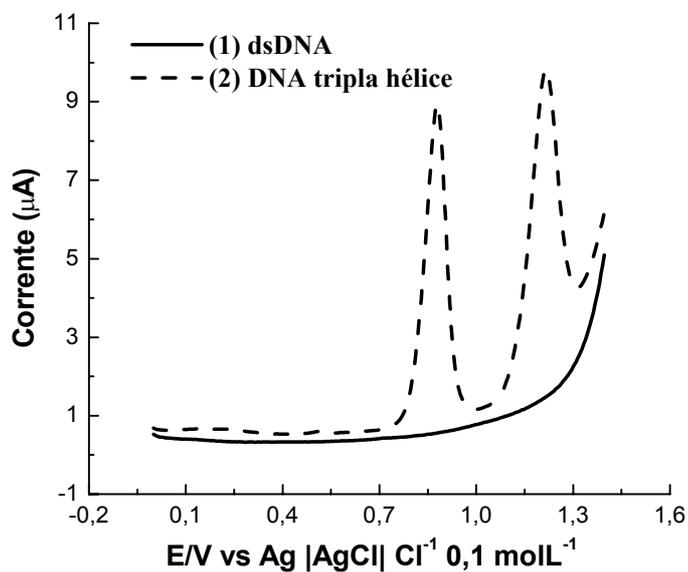
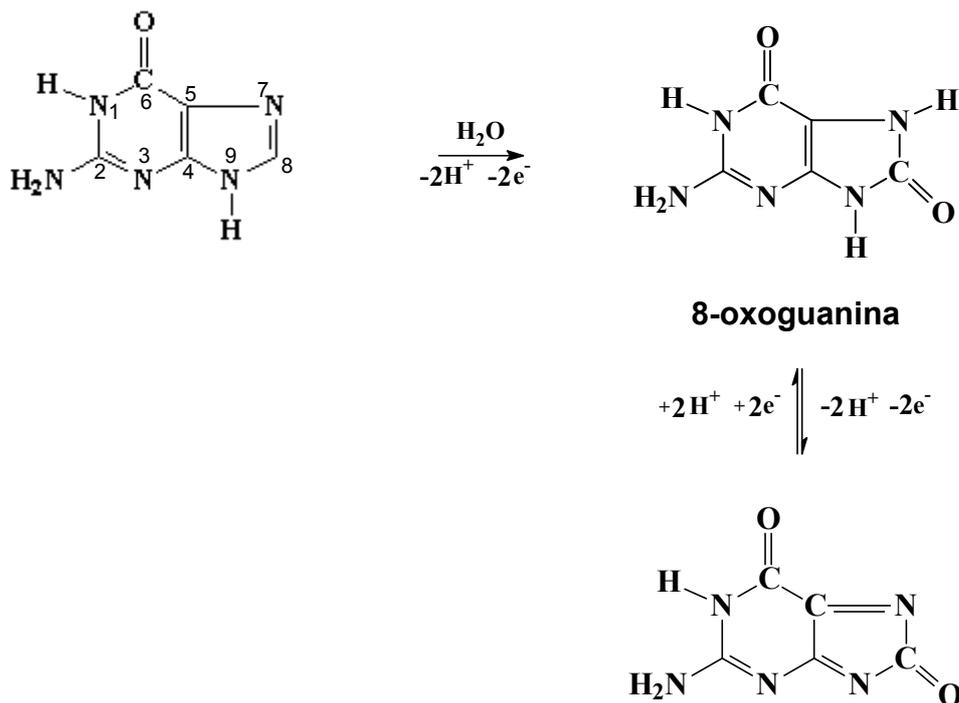
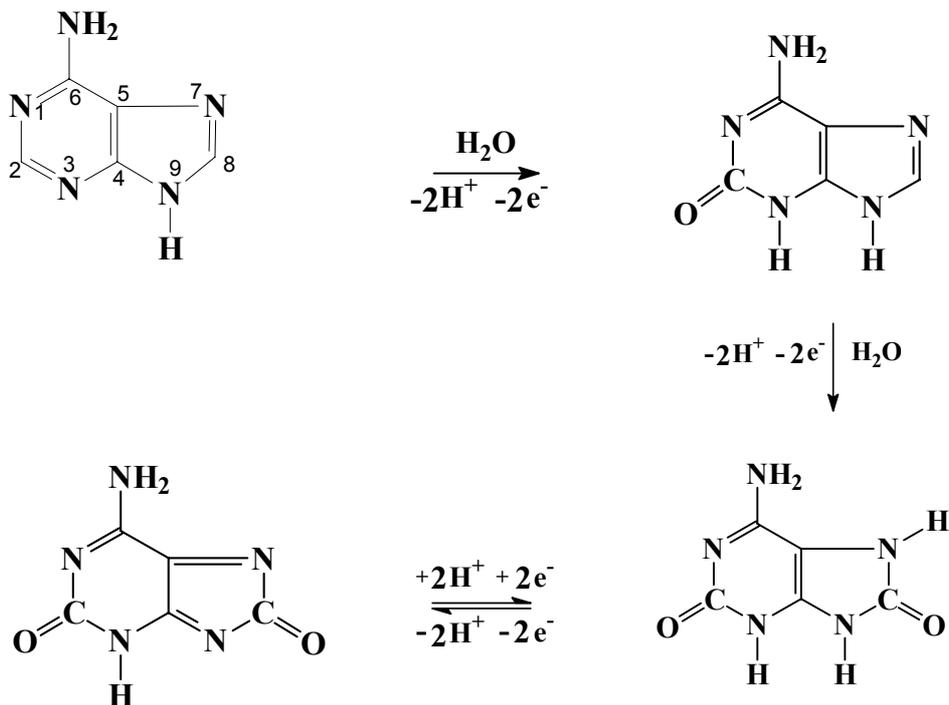


Figura 67. Voltametria de pulso diferencial em biossensor de *dsDNA*. (1) Biossensor de *dsDNA* imerso na solução tampão acetato (pH=4,5); (2) Biossensor de *dsDNA* imerso na solução ssDNA, originando a hélice tripla.

O mecanismo de oxidação da guanina e adenina se encontra definido na literatura e ocorre em mecanismo de duas etapas, com a perda total de quatro elétrons e quatro prótons, com participação de água, de acordo com o mecanismo abaixo²⁶.

Guanina

AdeninaFigura 68. Esquema para a oxidação das bases púricas²⁶.

Como foi visto anteriormente, em eletrodo de carbono vítreo, o ácido calvático mostrou um pico de redução em potencial de $-0,356$ V e nenhum pico na faixa de oxidação de 0 a $+1,400$ V. Ao imergir o biossensor de DNA na solução do ácido

calvático ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) e fazer uma varredura de 0 a $+1,400 \text{ V}$ não se observou qualquer pico de oxidação. Fez-se também uma varredura, nessa mesma faixa de potencial, após reduzir o ácido calvático por 120 s em potencial de $-0,400 \text{ V}$, e ainda assim não apareceram ondas de oxidação. O biossensor de *dsDNA* manteve-se inalterado.

Nesses experimentos é importante comparar o comportamento eletroquímico do analito, no caso, o ácido calvático, em carbono vítreo e em biossensores. Os seguintes resultados foram obtidos.

Em varredura de $-0,600$ a $+1,400 \text{ V}$, i.e, em direção anódica, observou-se a presença de duas ondas de oxidação denominadas IIa ($E_{p_{IIa}} = -0,275 \text{ V}$) e IIIa ($E_{p_{IIIa}} = -0,008 \text{ V}$). A racionalização do processo indica a redução inicial do ácido calvático, uma vez que o potencial inicial é mais negativo do que o potencial de redução de **1**. A redução deve gerar o derivado hidrazoaromático. Esse se mantém na superfície do eletrodo e pode ser oxidado a azoaromático.

Na varredura no sentido anódico para o catódico ($+0,600 \text{ V}$ a $-0,600 \text{ V}$), observam-se três ondas de redução, denominadas Ic ($E_{p_{Ic}} = -0,490 \text{ V}$), IIc ($E_{p_{IIc}} = -0,270 \text{ V}$) e IIIc ($E_{p_{IIIc}} = -0,003 \text{ V}$). A onda Ic relaciona-se à redução do ácido calvático ao derivado hidrazo pela transferência de $4e^- / 4H^+$. Esse hidrazo formado faz parte de um sistema redox reversível, que por perda de $2e^- / 2H^+$ é transformado em derivado azo. Esse, por sua vez, na superfície do biossensor sofre redução (ondas IIc e IIIc) regenerando o hidrazo. O gráfico **C** da Figura 69 mostra que na primeira varredura de $+0,600 \text{ V}$ a $-0,600 \text{ V}$ já aparecem as ondas de redução IIc e IIIc referentes à redução do azocomposto. Isso aconteceu porque esse estudo foi realizado com o mesmo biossensor e a mesma solução logo após ter percorrido a faixa de $-0,600 \text{ V}$ a $+1,400 \text{ V}$, onde houve a oxidação do derivado hidrazo a azo, permanecendo na superfície do biossensor. Nota-se, também, que na segunda varredura de $+0,600 \text{ V}$ a $-0,600 \text{ V}$ a onda Ic diminui por causa do consumo do ácido calvático na superfície do biossensor, gerando mais produto com conseqüente aumento na onda IIIc. A partir da terceira varredura, as correntes permanecem constantes (Figura 69C).

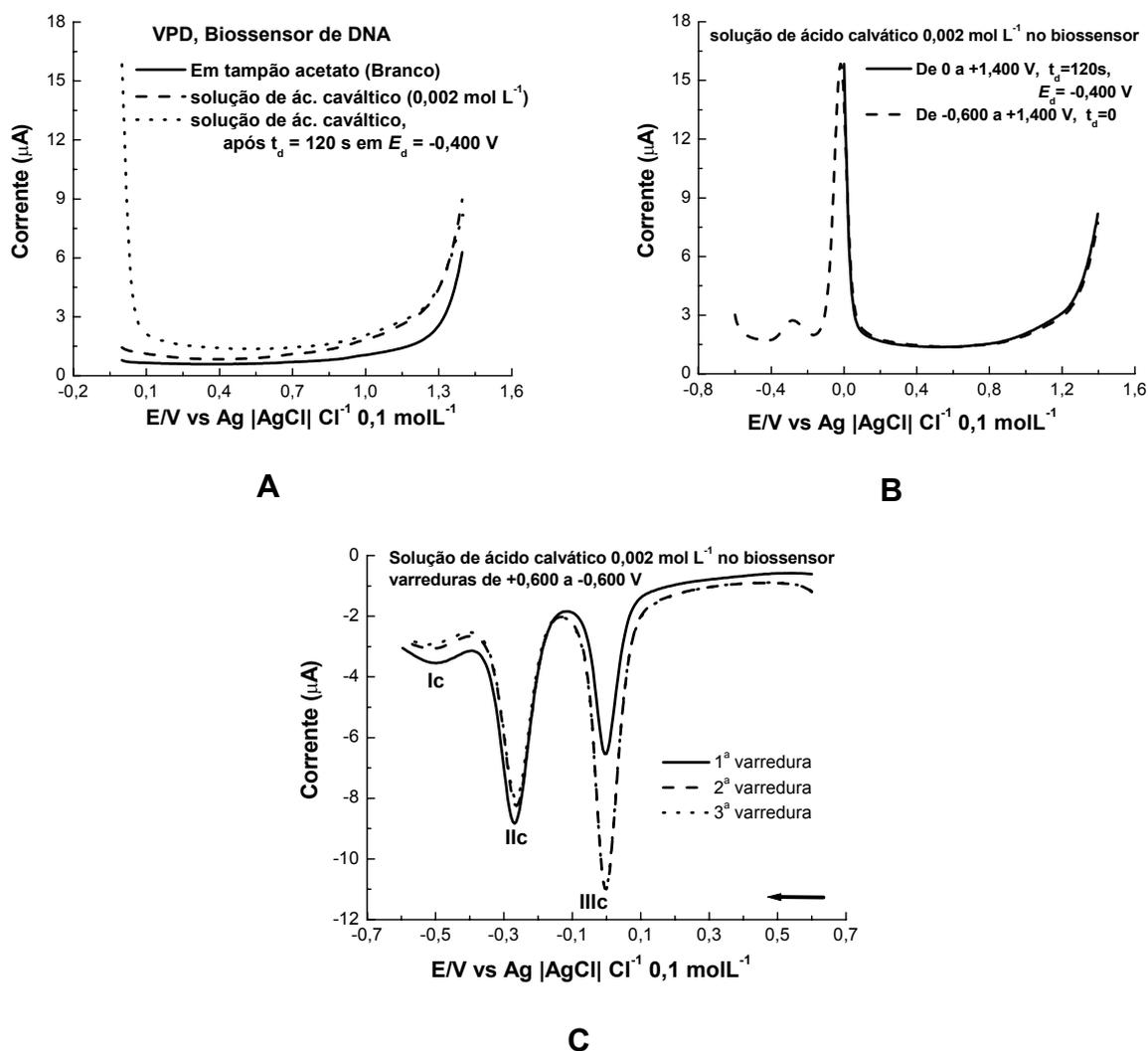


Figura 69. Voltametria de pulso diferencial de uma solução de ácido calvático (0,002 mol L⁻¹) em biossensor de *dsDNA*. (A e B) VPD sentido anódico. (C) VPD sentido catódico.

Foram realizadas varreduras similares às anteriores, desta vez com o ácido calvático incorporado na matriz do biossensor de *dsDNA*. Após a adição de 50 μ L da solução de ácido calvático (0,002 mol L⁻¹), deixou-se em contato por 24 horas; adicionaram-se 10 mL de tampão acetato à cela e fez-se a primeira varredura em voltametria de pulso diferencial na faixa de 0 a +1,400 V. O voltamograma, representado na figura 70A, não mostrou qualquer evidência de que o ácido calvático pudesse ter causado algum dano à molécula de DNA, pois não apareceram os picos de oxidação das respectivas bases. No entanto, observaram-se ondas de redução e oxidação referentes ao mecanismo redox do ácido calvático. O comportamento eletroquímico do ácido calvático incorporado ao biossensor de

dsDNA foi semelhante ao observado para a solução de ácido calvático em contato com o biossensor, descrito acima.

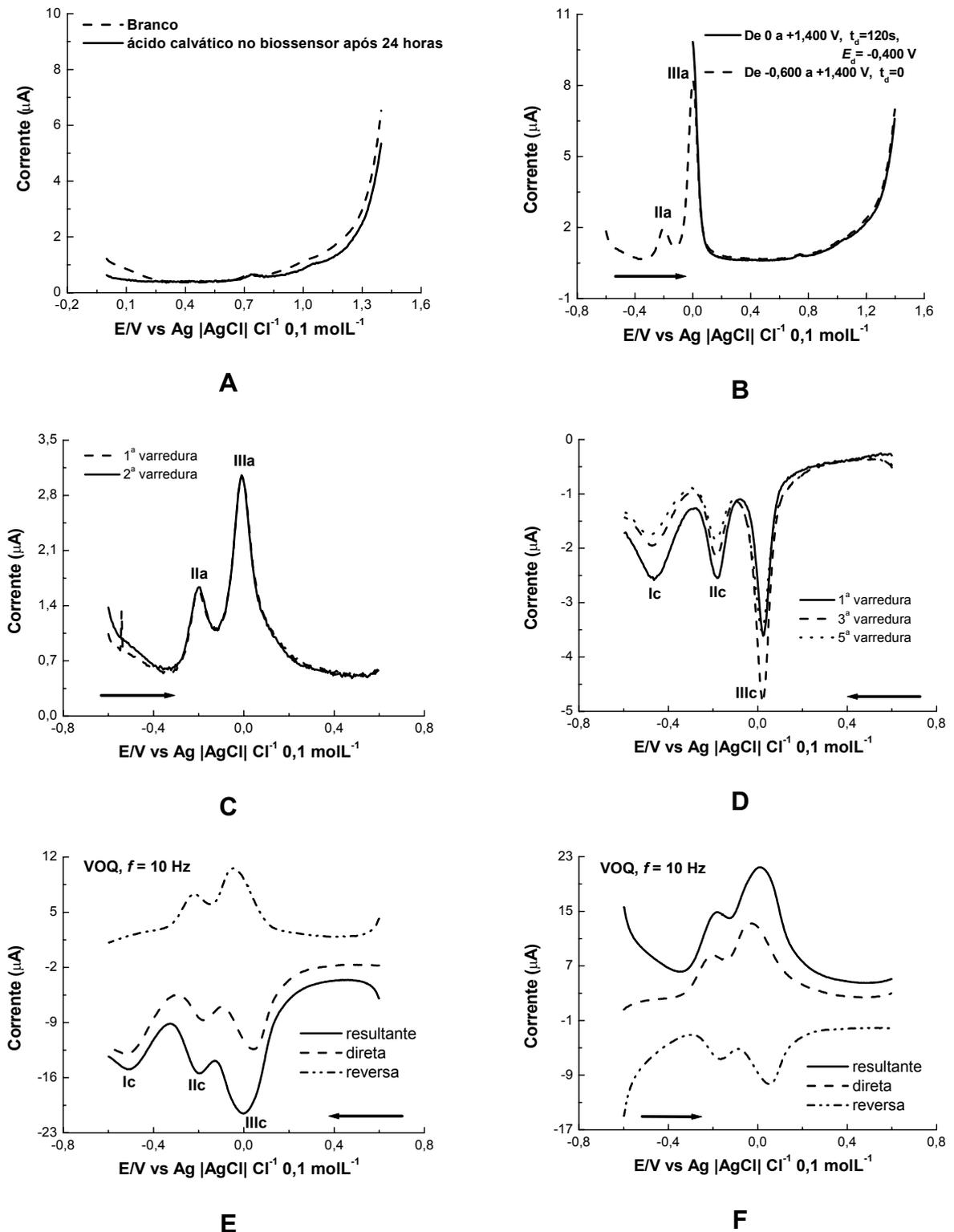


Figura 70. Ácido calvático (50 μL , 0,002 mol L⁻¹) após 24 horas de contato com o biossensor de *dsDNA*. (A) Primeira varredura de VPD após a imersão do Biossensor na solução tampão acetato (pH=4,5); (B e C) VPD sentido anódico. (D) VPD sentido catódico. (E) VOQ sentido catódico. (F) VOQ sentido anódico.

Nas varreduras do sentido catódico para o anódico, observam-se as duas ondas de oxidação IIa ($E_{p_{IIa}} = -0,199$ V) e IIIa ($E_{p_{IIIa}} = -0,006$ V). No entanto, ao percorrer a faixa do sentido anódico para o catódico (+0,600 V a -0,600 V), observam-se três ondas de redução, Ic ($E_{p_{Ic}} = -0,465$ V), IIc ($E_{p_{IIc}} = -0,183$ V) e IIIc ($E_{p_{IIIc}} = -0,022$ V). Ao fazer varreduras subseqüentes, a onda IIIc aumenta até atingir um máximo logo na terceira varredura, acompanhada de uma diminuição da onda Ic (Figura 70D). O sistema redox reversível hidrazo/azo está representado pelas ondas IIc/IIa e IIIc/IIIa. Essa reversibilidade está claramente exposta na voltametria de onda quadrada (Figura 70E-F), onde se nota a presença das ondas nas varreduras direta e reversa, fato característico de sistemas reversíveis. Já a onda Ic só aparece na varredura em sentido catódico e não apresenta a componente de varredura reversa, devido à sua irreversibilidade. Os pares de ondas IIc/IIa e IIIc/IIIa representam o mesmo sistema redox hidrazo/azo devido à presença de duas espécies que podem estar presentes na superfície do biossensor: o produto de redução do ácido calvático na sua forma protonada ou na forma de sua base conjugada (desprotonada). Isso ocorre pelo fato de que os experimentos foram realizados em pH = 4,5 que é próximo ao pKa do ácido calvático (pKa = 3,3), possibilitando a presença das duas espécies provenientes da sua dissociação. Com o objetivo de comprovar essa afirmação, experimento similar foi realizado em pH mais alto (pH = 5,6) e também com o composto **2**, similar não substituído do ácido calvático, com exclusão óbvia de a possibilidade de dissociação ácida.

Em pH = 5,6, em eletrodo de carbono vítreo, o ácido calvático apresentou uma única onda de redução, Ic. Em biossensor de dsDNA, após 24 horas, não apareceu qualquer onda de oxidação na faixa de 0 a +1,400 V (Figura 71A). Na varredura em sentido anódico, a partir de -0,600 V, observam-se duas ondas de oxidação e em sentido catódico três ondas de redução, com mecanismo semelhante ao do pH = 4,5 (Figura 71B-C). Ao compararmos os voltamogramas obtidos nos pH 4,5 e 5,6, podemos observar que são muito semelhantes, com diferenças nas alturas de correntes das ondas IIc e IIIc. Em pH = 5,6, a onda IIc é um pouco menor do que em pH = 4,5; enquanto que a onda IIIc, em pH = 5,6, assume uma intensidade bem maior (Figura 71D).

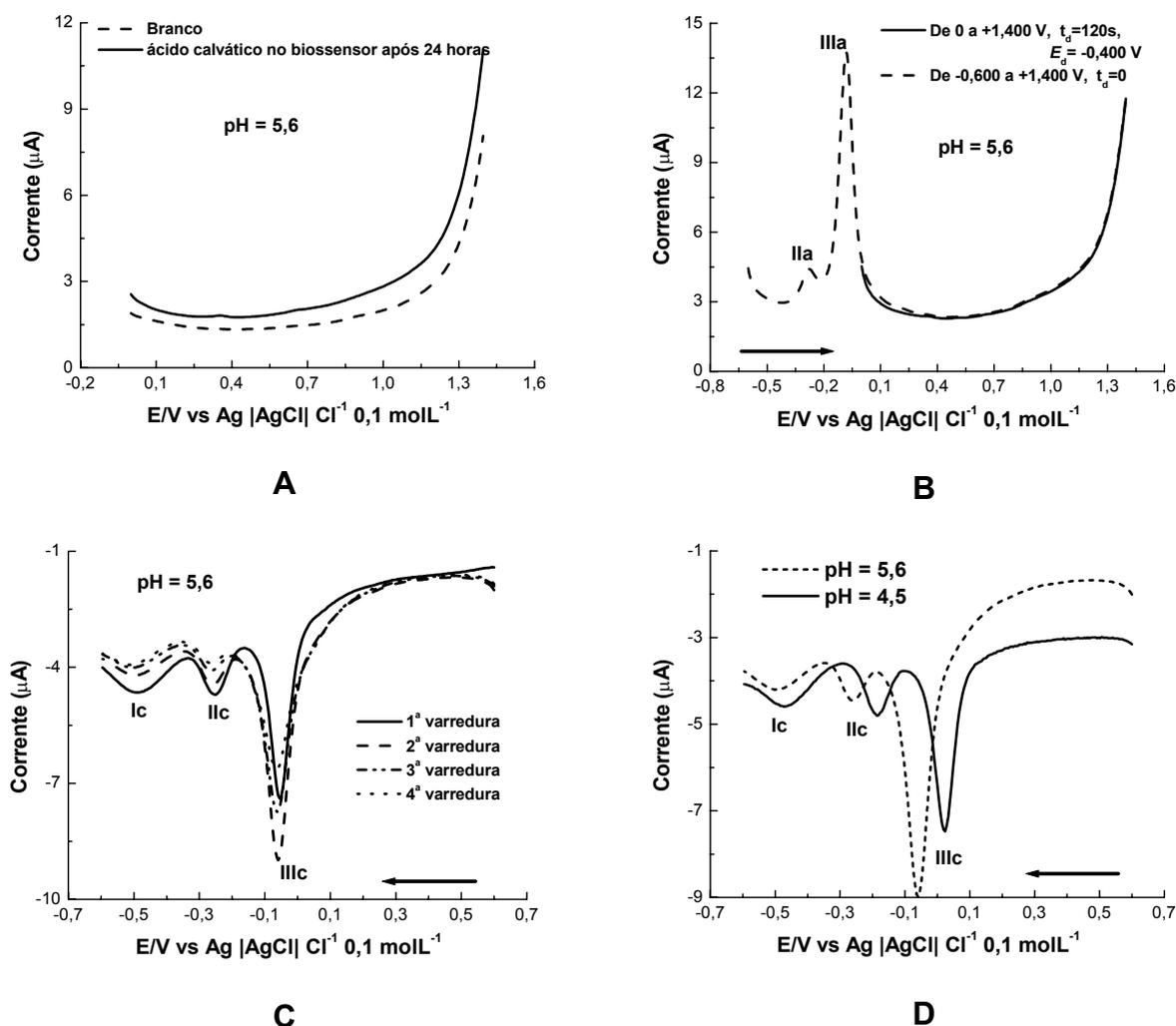


Figura 71. Ácido calvático ($50 \mu\text{L}$, $0,002 \text{ mol L}^{-1}$) após 24 horas de contato com o biossensor de *dsDNA*. (A) Primeira varredura de VPD após a imersão do Biossensor na solução tampão acetato ($\text{pH}=5,6$); (B) VPD sentido anódico. (C) VPD sentido catódico. (D) VPD sentido catódico, comparação entre os pH 's 4,5 e 5,6.

A voltametria de pulso diferencial de **2** apresentou, em carbono vítreo, uma única onda de redução denominada I_c ($E_{pI_c} = -0,363 \text{ V}$) (Figura 72A). Ao colocar o biossensor na solução de **2** ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) e fazer uma varredura de 0 a $+1,400 \text{ V}$, não se observa qualquer pico de oxidação. Fez-se também uma varredura, nessa mesma faixa, após reduzir **2** por 120 s em potencial de $-0,600 \text{ V}$, e ainda assim, nenhum pico evidente de oxidação foi observado (Figura 72B). Ao fazer uma varredura do sentido anódico para o catódico ($+0,600 \text{ V}$ a $-0,600 \text{ V}$) observam-se duas ondas de redução, denominadas I_c ($E_{pI_c} = -0,384 \text{ V}$) e II_c ($E_{pII_c} = -0,101 \text{ V}$). A onda I_c é relativa a redução do grupo azoxi a hidrazo, e a onda II_c equivale a redução reversível do azocomposto formado para hidrazo. Ao fazer varreduras

subseqüentes, observa-se um aumento na corrente da onda IIc e uma diminuição na corrente da onda Ic, permanecendo constante a partir da sexta varredura (Figura 72B).

Em biossensor de *dsDNA*, após vinte e quatro horas de contato, não se evidenciou qualquer interação com o biossensor, pela ausência de ondas anódicas na faixa de 0 a +1,400 V (Figura 72C). Após aplicar um potencial de condicionamento de -0,600 V por 120 s e logo, em seguida, iniciar a varredura de 0 a +1,400 V, observa-se que não houve modificação no voltamograma anterior (Figura 72C).

Na varredura do sentido anódico para o catódico (+0,600 V a -0,600 V) observam-se duas ondas de redução, denominadas Ic ($E_{pIc} = -0,490$ V) e IIc ($E_{pIIc} = -0,270$ V). A onda Ic envolve a redução do grupo azoxi a hidrazo pela transferência de $4e^- / 4H^+$. Esse mecanismo é similar ao do ácido calvático. O hidrazo formado é convertido a azo através do sistema redox reversível envolvendo a perda de $2e^- / 2H^+$, e o azo na superfície do biossensor sofre redução (onda IIc) regenerando o hidrazo. Na primeira varredura de +0,600 V a -0,600 V aparece a onda de redução IIc referente à redução do azocomposto porque ela foi feita após ter permanecido em um potencial de -0,600 V por 120 s e percorrida a faixa de 0 V a +1,400 V, onde houve a oxidação do derivado hidrazo a azo, permanecendo na superfície do biossensor (Figura 72D). As correntes de pico não variam mais nas varreduras subseqüentes.

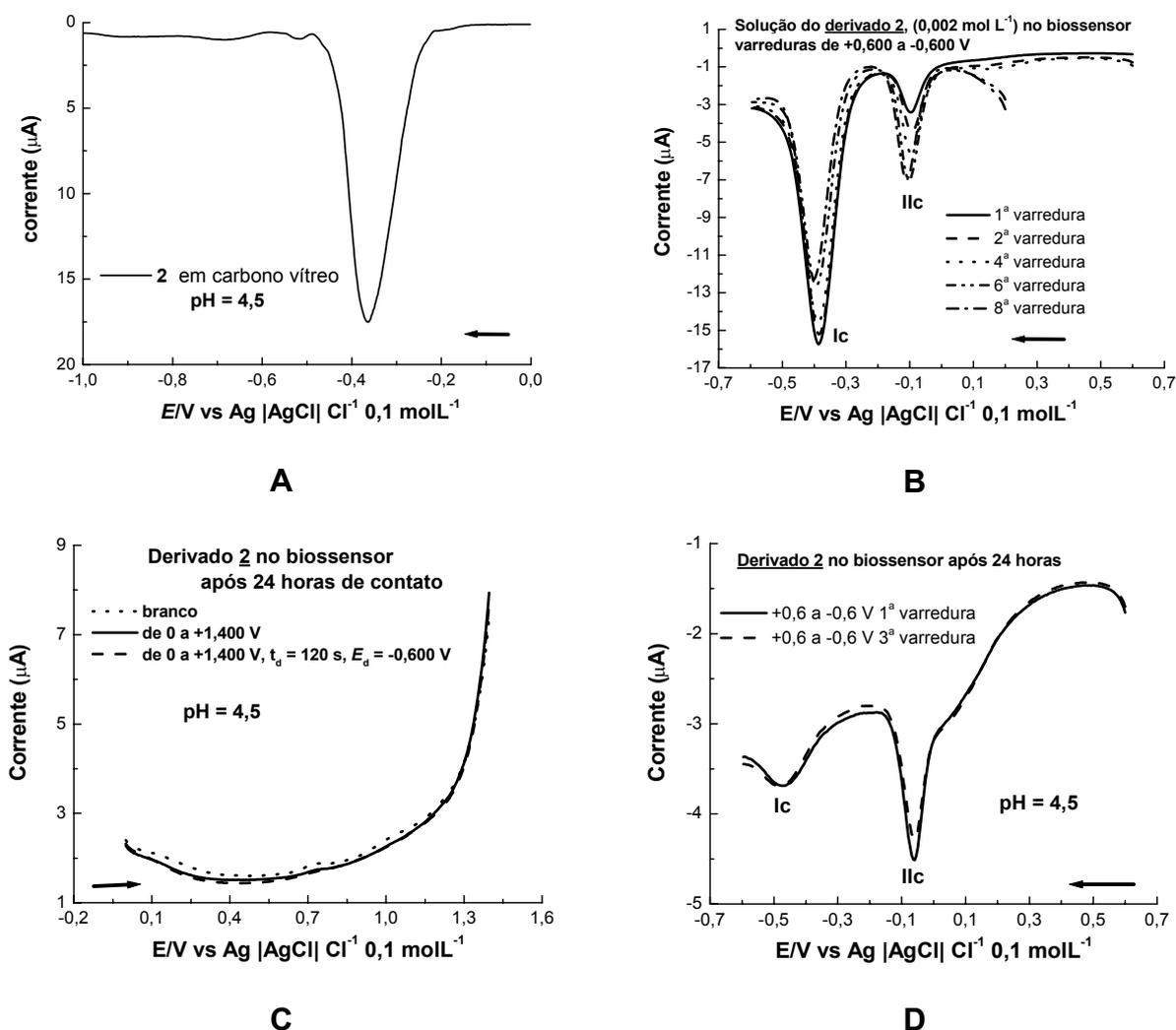


Figura 72. Composto 2 (solução a 0,002 mol L $^{-1}$) em (A) carbono vítreo e em (B) biossensor de dsDNA. (C) e (D) Composto 2 (50 μL , 0,002 mol L $^{-1}$) após 24 horas de contato com o biossensor de dsDNA. (C) VPD após a imersão do Biossensor na solução tampão acetato (pH=4,5), faixa de 0 a +1,400 V; (D) VPD sentido catódico, de +0,600 V a -0,600 V.

Observando-se as voltametrias do ácido calvático e de **2**, nota-se uma onda de redução que está presente no ácido (onda Ilc $_1$, Figura 73) e não está presente em **2**. As ondas Ilc $_1$ e Ilc $_2$ no ácido e Ilc $_1$ em **2**, são referentes a redução do azocomposto a hidrazo. A onda Ilc $_1$, que aparece apenas no voltamograma do ácido calvático, ocorre devido à presença de duas formas passíveis de redução que o ácido calvático apresenta, que são: o ácido na sua forma protonada ou na forma de sua base conjugada (desprotonada). Todo o mecanismo de redução e oxidação do ácido calvático envolve essas duas espécies, em equilíbrio, provenientes de sua dissociação, por isso observamos duas ondas de oxidação do hidrazo a azocomposto (ondas IIa e IIIa) e duas ondas de redução do azocomposto a hidrazo

(ondas IIc e IIIc). O grupo ácido protonado na posição *para* ao grupo eletroativo cianoazoxi vai facilitar a redução desse grupo, quando em comparação com o carboxilato (base conjugada do ácido). Com isso, supõe-se que a onda IIc, em potencial mais negativo, deve corresponder à redução da forma desprotonada e a onda IIIc, que ocorre em potencial mais positivo, àquela da forma protonada.

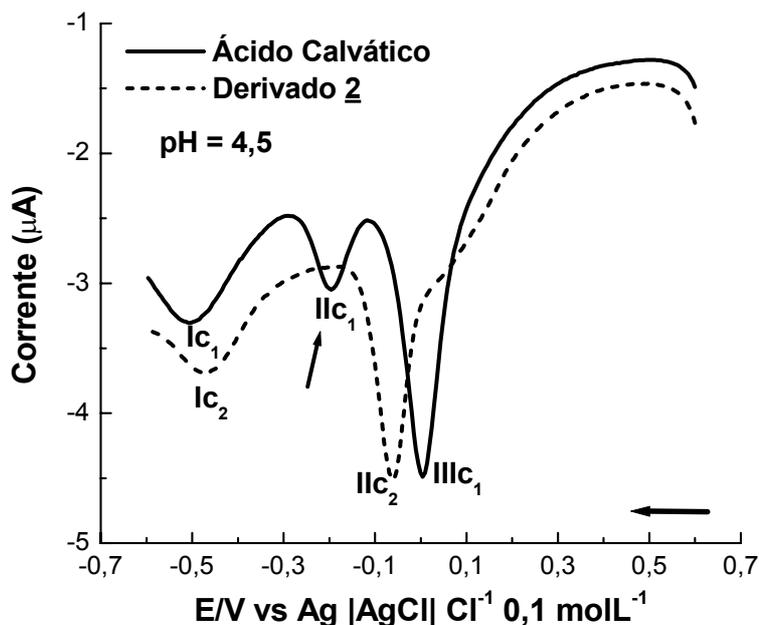
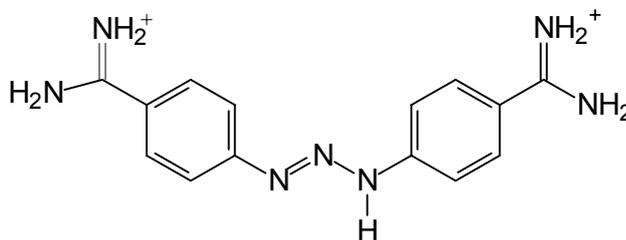


Figura 73. Comparação entre os voltamogramas (em VPD) do Ácido calvático (1) e do composto 2 (C_1 e $C_2 = 0,002 \text{ mol L}^{-1}$, quantidade adicionada ao biossensor = $50 \mu\text{L}$), obtidos após 24 horas de contato com o biossensor de dsDNA.

Em todos os experimentos acima descritos com o ácido calvático, em pH = 4,5 e 5,6, e também com o composto 2, não se observou qualquer possível dano ao dsDNA, pois nenhuma onda de oxidação com potencial referente aos potenciais de oxidação das bases do DNA foi observada.

Os mecanismos de ação biológica dos 2 compostos, muito ativos biologicamente, inclusive tóxicos, não devem envolver atuação sobre o DNA. Podem estar relacionados à reatividade da função ciano-NNO-azoxi com resíduos de cisteína de alguns endobióticos (ver introdução, página 32)^{55,56,57}.

5.5 – ESTUDO DO COMPORTAMENTO DO BERENIL FRENTE AO BIOCSENSOR DE *dsDNA*



Berenil

O mecanismo de redução do berenil foi investigado anteriormente em eletrodo de mercúrio⁹⁴. Em eletrodo de carbono vítreo, em tampão acetato pH = 4,5, resultados similares foram obtidos; observou-se, em voltametria cíclica, uma única onda de redução irreversível (ausência de onda anódica, potencial dependente da velocidade de varredura), envolvendo a captura de $2e^-/2H^+$, com $E_{plc} = -0,996$ V a $0,100$ V s⁻¹ (Figura 74A). A voltametria de pulso diferencial mostrou uma onda em $-0,945$ V (Figura 74B). O mecanismo de redução envolve captura eletrônica pela função triazeno (Figura 75)⁹⁵.

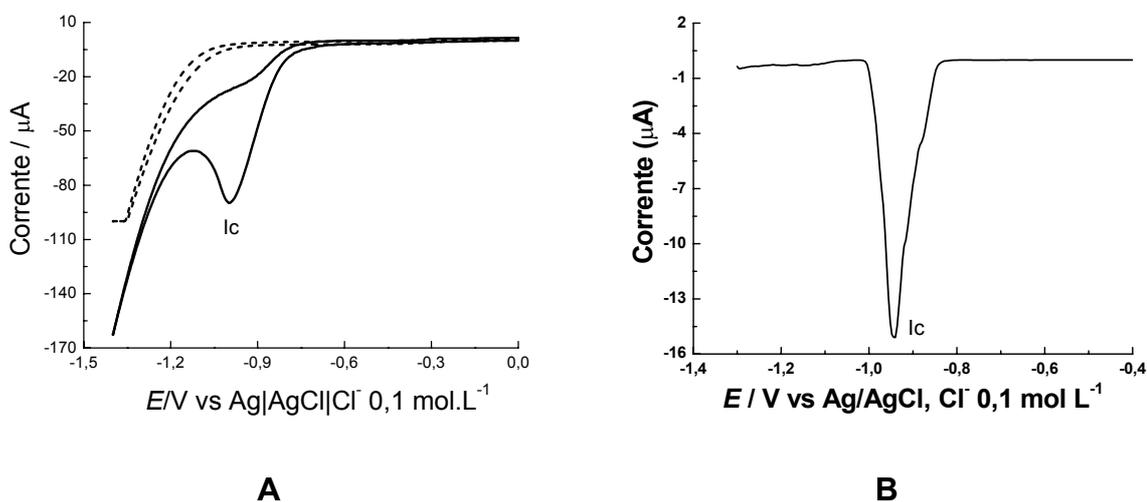


Figura 74. Berenil ($0,001$ mol L⁻¹), em eletrodo de carbono vítreo, tampão acetato (pH=4,5). (A) Voltametria Cíclica, a $0,100$ V s⁻¹. (B) Voltametria de pulso diferencial.

⁹⁴ ROIG, A. *et al. J. Pharm. Sciences*, **1993**, 82, 251-253.

⁹⁵ WEI, X.D., SPEISER, B., *Electrochim. Acta*, **1995**, 40, 2477-2482.

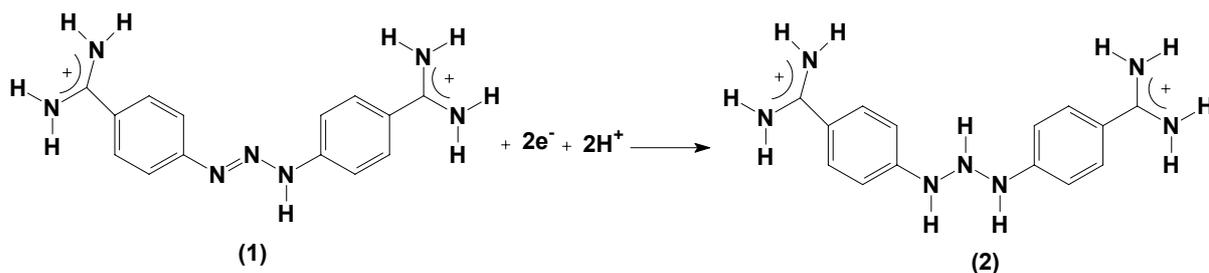


Figura 75. Provável mecanismo de redução do berenil.

Na varredura em sentido anódico, em voltametria cíclica e eletrodo de carbono vítreo, a oxidação do berenil foi representada por uma onda bem definida e irreversível (ausência da onda correspondente catódica, E_{pla} muda com a velocidade de varredura) (Figura 76A). Como mostrado para redução o grupo triazeno seria o mais provável para a oxidação. A oxidação de triazenos foi relatada antes, mas exclusivamente em meio aprótico; formando cátions radicais, que quebram para gerar íons diazônio⁷⁹. A coulometria da oxidação do berenil, realizada em $E_{ap} = +1,100V$, levou ao consumo de 2 mols de elétrons (Figura 76B). O mecanismo eletroquímico de oxidação do berenil, em meio aquoso, não foi detalhado nesse trabalho.

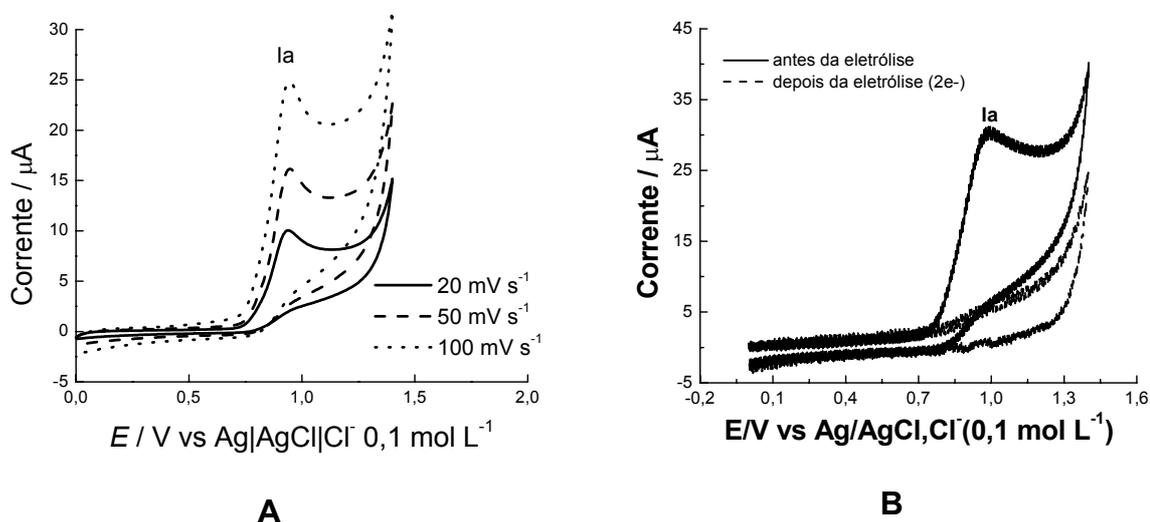


Figura 76. Berenil ($0,001 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de carbono vítreo, tampão acetato ($\text{pH}=4,5$), Voltametria Cíclica. (A) velocidades diferentes. (B) a $0,100 \text{ V s}^{-1}$ antes e após a eletrólise.

Foi realizado o estudo eletroquímico do berenil (em solução) em biossensor de *dsDNA*, observando o efeito da concentração e do tempo de exposição. A figura 77A mostra o efeito da concentração do berenil dissolvido em tampão acetato, após 5 horas de contato com o biossensor. Em concentrações menores de berenil

($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) apenas uma onda de anódica (Ia) é evidente. Com o aumento da concentração, a onda Ia aumenta e sofre um deslocamento anódico. Nenhuma evidência de dano ao DNA é observada com essas concentrações baixas. É possível que o berenil intercale, sem causar dano às nucleobases. Na concentração de $c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, observou-se a presença de uma onda alargada, com um pequeno ombro em $E_{pa} = +0,863 \text{ V}$, que deve estar relacionado à oxidação da guanina, indicando que houve dano ao DNA. A presença da onda de oxidação da guanina foi mais evidente com o aumento do tempo de exposição, como se pode ver na figura 77B após 24 horas, mostrando que o dano é um processo lento.

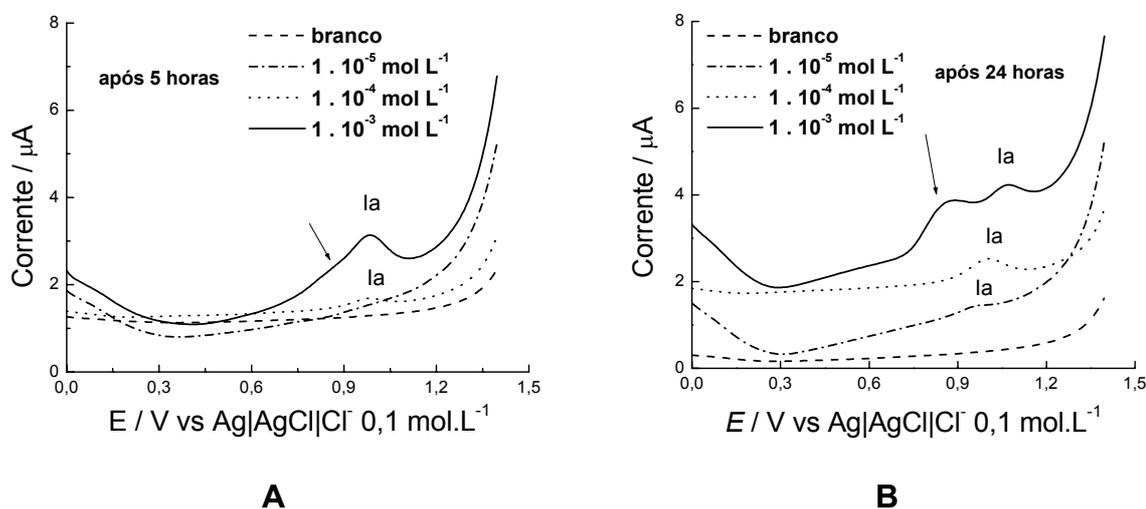


Figura 77. Voltametria de pulso diferencial de soluções de concentrações diferentes de Berenil, em tampão acetato, biossensor de *dsDNA*. (A) após 5 h de contato, (B) após 24 h de contato.

Experimentos adicionais foram realizados com $50 \mu\text{L}$ de uma solução de berenil, $c = 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, incorporada diretamente na camada do *dsDNA* no biossensor, após 24 horas de contato. Este tempo foi escolhido para permitir a completa secagem do gel. Os resultados são mostrados na figura 78. A voltametria de pulso diferencial do berenil, sob estas condições, apresentou duas ondas principais, Ia em $+0,840\text{V}$ e uma onda composta IIa (figura 78A).

Apesar da presença do pico original do Berenil, sua interação com o biossensor de *dsDNA* é claramente demonstrada na figura 78. Ondas adicionais e intensas foram observadas em $+0,770 \text{ V}$ e $+1,250 \text{ V}$ (figura 78A, destacadas com setas) e estão relacionadas à oxidação das nucleobases do DNA, guanina e adenina³⁷. O mesmo comportamento foi observado quando se usou $50 \mu\text{L}$ de

soluções com concentrações menores de berenil, $1,0 \times 10^{-4}$ e $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ (figura 78B). Para as concentrações de 5×10^{-6} mol L⁻¹, obteve-se um voltamograma limpo, isento de ondas, similar ao branco (biossensor em contato apenas com a solução de tampão acetato).

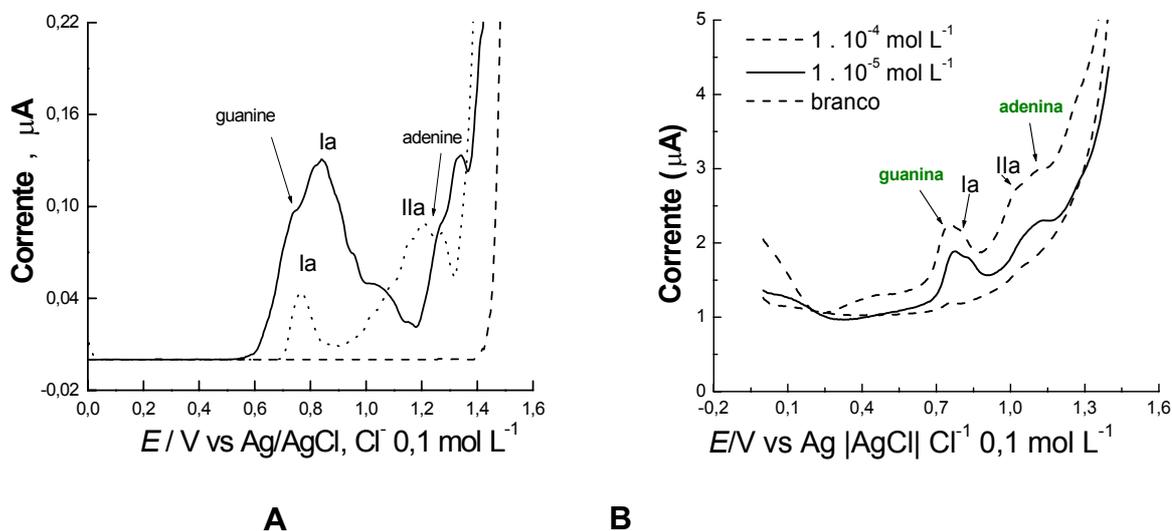


Figura 78. Voltametria de pulso diferencial do berenil (50 µL adicionados ao biossensor), em tampão acetato, biossensor de dsDNA, após 24 horas de contato. (A) Berenil, $c = 2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. (B) Berenil, $c = 1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e $c = 1 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Esses resultados revelam que o berenil interage com o dsDNA, alterando sua conformação, com conseqüente exposição de suas bases que podem, agora, serem oxidadas. O dano ao DNA é dependente da concentração do berenil e pode ser visualizado em concentrações da ordem de 10^{-5} mol L⁻¹, quando ele é diretamente incorporado ao gel. Quando em solução, os picos diagnósticos de oxidação da guanina somente aparecem com concentrações de berenil mais altas, em 10^{-4} mol L⁻¹, sendo claramente visualizado em concentrações de berenil da ordem de 10^{-3} mol L⁻¹. O dano causado pelo berenil no DNA foi, também, dependente do tempo de exposição. De um ponto de vista qualitativo, a preparação do gel composto: analito + dsDNA e contato de 24 horas é o método de escolha para observação da interação com dano ao DNA.

A partir dos dados obtidos e com base na literatura, fez um experimento com o berenil junto a uma solução de ssDNA em carbono vítreo. A solução de ssDNA apresentou em carbono vítreo duas ondas de oxidação referente as suas bases guanina e adenina. Após adicionarmos o berenil a essa solução de ssDNA e

fazermos a varredura anódica, observou-se que a onda relacionada a oxidação da adenina praticamente desapareceu, e a onda de oxidação do berenil se mostra num potencial bem próximo a oxidação da guanina. É conhecido que o berenil ao intercalar a molécula de DNA dá preferência à base adenina. Confirma-se então que o berenil reagiu com a base adenina de imediato e que, agora, a concentração de adenina disponível em solução para ser oxidada diminuiu bastante.

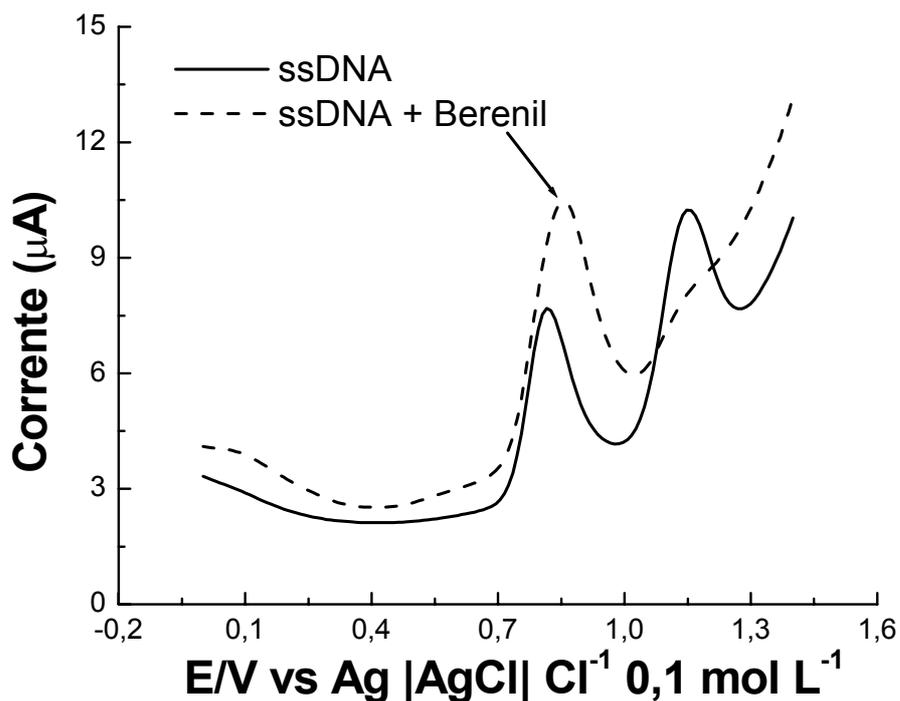
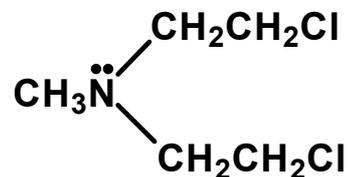


Figura 79. VPD de ums solução de ssDNA na ausência e presença do berenil.

5.6 – ESTUDO DO COMPORTAMENTO DA MECLORETAMINA FRENTE AO BIOSSENSOR DE dsDNA



Experimentos eletroquímicos realizados com a mecloretamina, voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, indicaram a ausência de ondas de redução e a presença de uma única onda de oxidação bieletrônica, em $E_{pa} = +1,036$ V (figura 80A-B), de controle difusional ($I_{pa} \propto v^{1/2}$) e irreversível (E_{pa} dependente da velocidade de varredura, ausência de onda catódica correspondente) (Figura 80C-D).

A determinação do número de elétrons abstraídos, quando da oxidação da mecloretamina, foi feita via coulometria. Utilizaram-se 20 mL da solução tampão acetato, pH aparente 4,5, a massa usada foi 0,01006 g ($2,613 \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹). Os potenciais aplicados foram: na pré-eletrólise $E_{ap} = +1,300$ V e na eletrólise $E_{ap} = +1,250$ V.

Como observado no experimento de coulometria, após o consumo de dois mols de elétrons, a onda anódica desaparece (Figura 80B).

Essa onda se refere, provavelmente, à oxidação do grupo amina terciário. A oxidação eletroquímica de aminas alifáticas simples é complexa e pode levar a uma variedade de produtos⁹⁶.

O potencial de oxidação depende da estrutura. Aminas terciárias são mais facilmente oxidadas do que aminas secundárias e primárias. Geralmente, na primeira etapa, a amina terciária é oxidada ao cátion radical, o qual apresenta uma ligação $C\alpha - H$ fraca. O átomo de hidrogênio é abstraído levando a um íon imínio, que pode hidrolisar e dar origem a aldeídos e aminas, ou adicionar a um nucleófilo, dando produtos substituídos^{80,97}. A discussão completa da oxidação anódica desse grupo não foi o foco desse trabalho.

⁹⁶ STECKHAN, E. In *Organic Electrochemistry*; Lund, H., Baizer, M., Eds., 3rd edition, Marcel Dekker: New York, **1991**; pp. 582.

⁹⁷ NELSEN, S. F.; IPPOLITI, J. T. *J. Amer. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 4879.

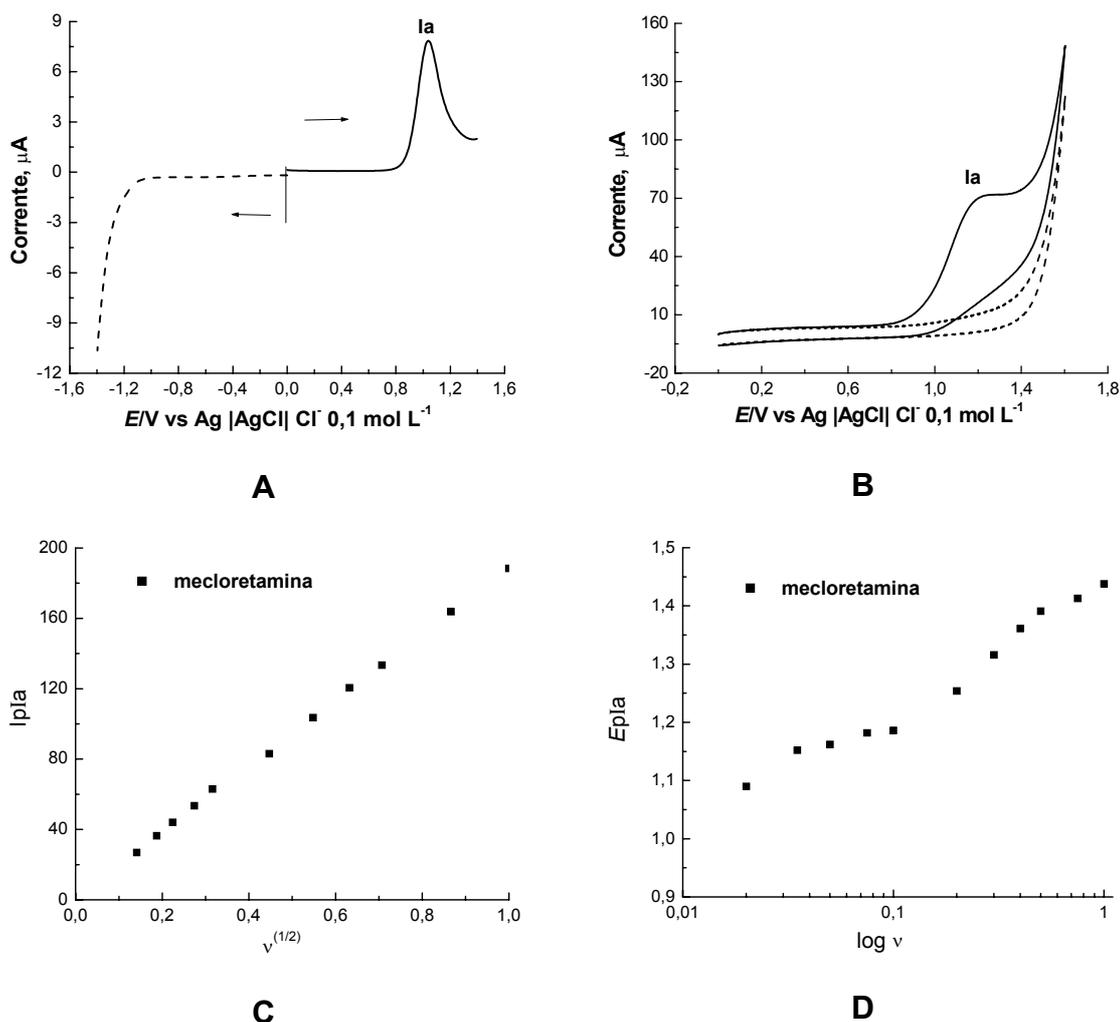


Figura 80. Mecloretamina ($0,004 \text{ mol L}^{-1}$), em eletrodo de carbono vítreo, tampão acetato ($\text{pH}=4,5$). A: Voltametria Cíclica, a $0,100 \text{ V s}^{-1}$. B: Voltametria de pulso diferencial, a $0,005 \text{ V s}^{-1}$. C: Gráfico de I_{pla} vs. $v^{1/2}$. D: Gráfico de E_{pla} vs. $\log v$.

O biossensor de DNA foi preparado como descrito anteriormente. A esse biossensor, adicionou-se uma solução de mecloretamina ($c = 0,004 \text{ mol L}^{-1}$) em tampão acetato e obteve-se o voltamograma de pulso diferencial mostrado na figura 81A. A corrente de pico aumentou com o aumento do número de varreduras, fato que sugere o acúmulo de mecloretamina na matriz de DNA. O experimento em que foi adicionado $50 \mu\text{L}$ de uma solução de mecloretamina ($c = 0,004 \text{ mol L}^{-1}$) ao biossensor e esperado um tempo de 24 horas em contato, foi comparado com o comportamento da mecloretamina, em tampão acetato $\text{pH} = 4,5$, no eletrodo de carbono vítreo (figura 81B). Observa-se que a onda de oxidação da mecloretamina sofre um pequeno deslocamento em sentido catódico no biossensor de *dsDNA*, indicativo de uma maior facilidade de oxidação ($E_{\text{pIIa}} = +0,947 \text{ V}$). Ondas adicionais

apareceram em comparação ao voltamograma em carbono vítreo ($E_{pIa} = +0,765$ V e $E_{pIIIa} = +1,076$ V). Esses picos estão relacionados a oxidação das bases guanina ($\approx +0,8$ V) e adenina ($\approx +1,0$ V), os quais são indicativos de dano ao DNA. Esse resultado mostra que a mecloretamina interage com o DNA como foi demonstrado na literatura com o uso de outras técnicas^{32,98}.

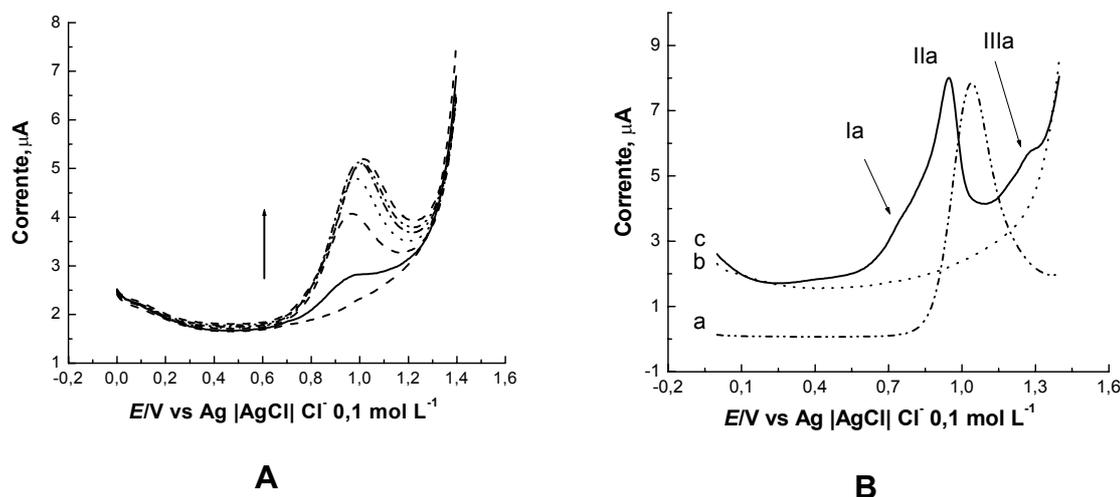


Figura 81. Voltametria de pulso diferencial da Mecloretamina (4 mmol L^{-1}), em tampão acetato, $\text{pH} = 4,5$. **A:** Em biossensor de *dsDNA*, varreduras sucessivas, a seta indica o aumento da corrente com o número de varreduras. **B:** (a) Mecloretamina em eletrodo carbono vítreo. (b) Branco (Biossensor de *dsDNA* em ausência de mecloretamina). (c) Mecloretamina em biossensor de *dsDNA* ($20 \mu\text{L}$ da solução 4 mmol L^{-1} aplicada ao gel de *dsDNA* e deixada em contato por 24 horas), 1ª varredura após 24 horas.

Foram realizados experimentos para visualizar os efeitos da concentração de mecloretamina e do tempo de exposição. Adicionou-se ao biossensor de *dsDNA*, uma solução de mecloretamina, de concentração conhecida, e foram registrados os voltamogramas de pulso diferencial em determinados intervalos de tempo. Ao mesmo tempo, em uma cela diferente, foi adicionado ao biossensor apenas o tampão acetato e registrados seus voltamogramas sob as mesmas condições experimentais que a mecloretamina. A curva desse biossensor, em tampão acetato, foi chamada de branco. Todas as curvas foram comparadas. Na concentração de $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, inicialmente, apenas uma onda anódica, denominada IIa, referente a oxidação da mecloretamina, foi observada (Figura 82A). Durante todo o tempo experimental, não se observou nenhuma alteração no voltamograma do branco. Após 3 horas de contato, uma onda anódica adicional (Ia) foi observada (Figura

⁹⁸ BRETT, A. M. O.; GOULART, M.O.F.; DE ABREU, F.C. *Biosensors and Bioelectronics*, **2002**, *17*, 913.

82A). Essa onda la está relacionada a oxidação de resíduos de guanina e a sua altura aumenta com o tempo de exposição, sendo melhor visualizada a partir de 6 horas de contato (Figura 82B). Comparando-se os voltamogramas após 10 e 24 horas de contato (Figura 82C), observa-se um aumento de 29,46 % na curva com o tempo de exposição maior. Na figura 82D, a uma concentração de $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, é difícil visualizar as ondas de oxidação das nucleobases do DNA, devido a uma maior intensidade de corrente na onda da mecloretamina.

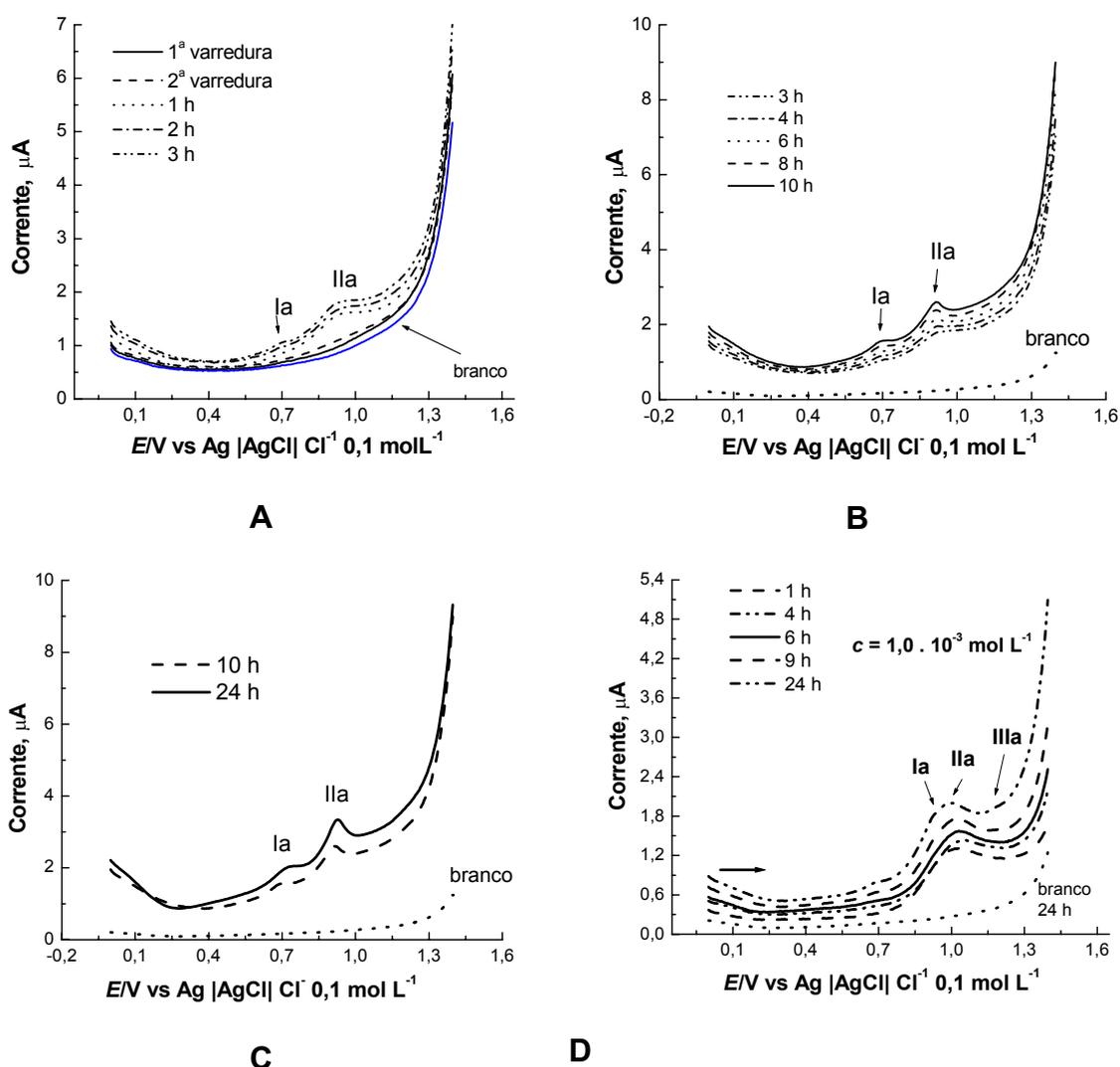


Figura 82. Efeito do tempo de exposição da mecloretamina em tampão acetato, pH = 4,5, no biosensor de *dsDNA*. A, B, C: $c = 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A: Tempo de exposição: 1 h; 2 h; 3 h. B: Tempo de exposição: 3, 4, 6, 8 e 10 h. Comparação entre 10 h e 24 h de contato em solução. D: $c = 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, tempo de exposição: 1 h; 4 h; 6 h, 9 h e 24 horas.

A figura 83 mostra o efeito da concentração de mecloretamina ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). A presença da onda anódica la, mais

evidente após o tempo de 24 horas de exposição, mostra que a mecloretamina em solução causa dano ao DNA ainda na concentração de $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 83A-B). Experimentos adicionais foram realizados com a mecloretamina em $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, adicionando-se $50 \mu\text{L}$ dessa solução ao gel de *dsDNA*; foi possível observar, após 24 horas, as ondas Ia e IIIa (relacionadas a oxidação da guanina e adenina, respectivamente). Comparando a curva c dos gráficos B e C da figura 83, que são referentes a mecloretamina ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em solução e diretamente no gel de *dsDNA*, pode-se observar que o último procedimento é mais sensível e deve ser o método de escolha. Os dois procedimentos devem, sempre, serem acompanhados pelo branco (biossensor em contato apenas com o tampão acetato).

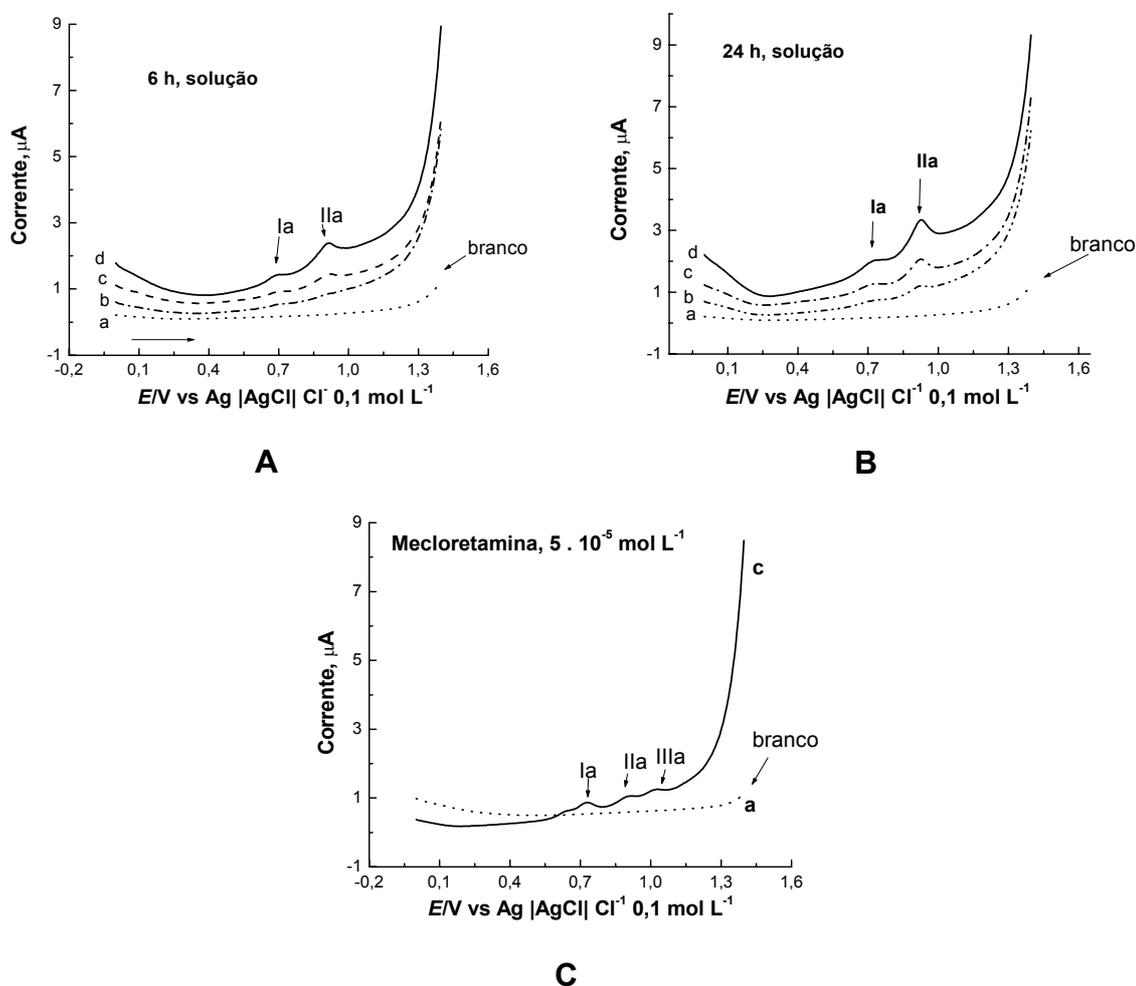


Figura 83. Efeito da concentração de mecloretamina, dissolvida em solução de tampão acetato, pH 4,5, no biossensor de *dsDNA*. Em todos os casos a curva (a) está relacionada ao branco. A: Comparação de diferentes concentrações de mecloretamina, (b) $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, (d) $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; após 6 h de contato. B: o mesmo após 24 horas de contato. C: $50 \mu\text{L}$ da solução $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, adicionados ao gel de *dsDNA*, varredura após 24 horas de contato.

Um mecanismo possível de interação com DNA no caso da mecloretamina já foi representado na literatura (Figura 84)⁹⁹.

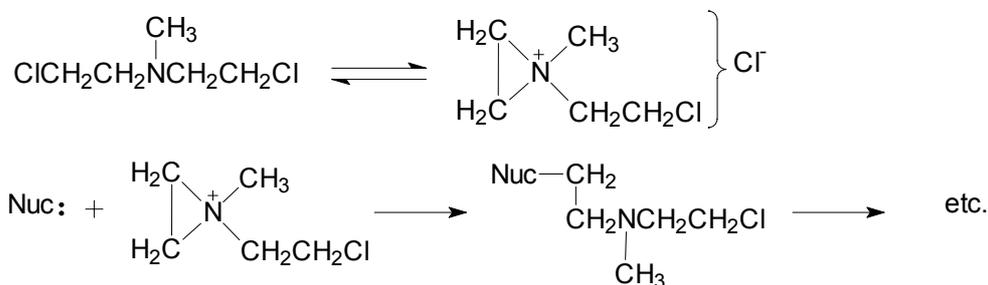


Figura 84. Mecanismo possível de interação do DNA no com a mecloretamina.

Foram realizados experimentos com uma amina terciária simples, a trietilamina, em biossensor de *dsDNA*, em tampão acetato, pH 4,5, como um controle para a mecloretamina. A figura 85 mostra os gráficos da trietilamina após 24 horas de contato com o biossensor de *dsDNA*. A figura 85A é referente a trietilamina em solução, a $0,002 \text{ mol L}^{-1}$, e a figura 85B está relacionada à adição de $50 \mu\text{L}$ de uma solução de trietilamina ($0,002 \text{ mol L}^{-1}$) no gel de *dsDNA*. Os resultados mostram que não houve interação com DNA em nenhum dos dois procedimentos.

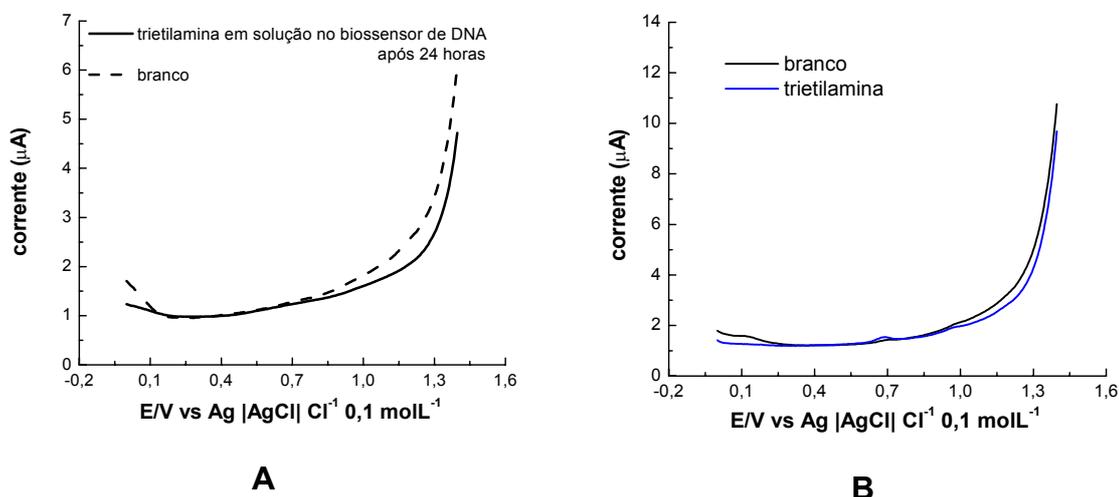


Figura 85. Trietilamina em tampão acetato, pH 4,5, no biossensor de *dsDNA*. A: Em solução, $c = 0,002 \text{ mol L}^{-1}$, após 24 horas de contato. B: $50 \mu\text{L}$ da solução $c = 0,002 \text{ mol L}^{-1}$, adicionados ao gel de *dsDNA*, varredura após 24 horas de contato.

⁹⁹ GEISSMAN, T.A. Principles of Organic Chemistry, 4.ed. 1977, p. 168-173.

6. CONCLUSÕES

O mecanismo de redução de ciano-azoxiaromáticos é facilitado por grupos eletroatraentes de acordo com a seguinte ordem para ambos os meios, prótico e aprótico: $\text{NO}_2 > \text{CN} > \text{Cl} > \text{H} > \text{CH}_3 > \text{OCH}_3 > \text{N}(\text{CH}_3)_2$. Quanto maior o efeito retirador de elétrons do substituinte, mais positivo o potencial de redução.

A presença de substituintes eletrodoadores, nos compostos **6**, **7** e **8**, dificulta o processo de redução deslocando o $E_{\text{pc}1}$ para valores mais negativos, tanto em meio prótico assim como para meio aprótico.

Os potenciais de redução dos azoxiaromáticos, em meio aprótico, correlacionam muito melhor com as constantes de substituinte $\sigma_p(\sigma^-)$, usado quando efeitos mesoméricos afetam, de fato, os potenciais de redução, podendo exercer interação ressonante direta com o sítio reacional rico em elétrons.

Os resultados apresentados indicam que o tratamento dos valores da aproximação das constantes dos substituintes de Hammett [$\sigma_p / \sigma_p(\sigma^-)$] pode ser aplicado com segurança a valores de $E_{\text{pc}1}$ de azoxiaromáticos em meio prótico e aprótico. A relação linear encontrada entre $\sigma_p / \sigma_p(\sigma^-)$ e $E_{\text{pc}1}$ pode ser expandida para prever o $E_{\text{pc}1}$ de outros compostos substituídos, com conseqüências benéficas em termos de planejamento de novos fármacos ou protótipos.

O comportamento eletroquímico do grupo azoxicianeto, mostra-se similar ao do grupo azoxi, com as devidas variações relativas à presença do grupo cianeto fortemente eletronegativo. Dois valores de pKa para o ácido calvático **1** e o pKa do seu similar **2**, medido através de VPD, mostrou-se similar ao registrado na literatura. A análise do efeito da concentração de **1** e **2** na corrente de $E_{\text{pc}1}$ mostrou linearidade entre a corrente de pico e a concentração, no entanto ainda pode ser melhorada com a otimização dos parâmetros da técnica e determinando-se os limites de detecção e quantificação.

O estudo eletroquímico do **ácido calvático** em biossensor de dsDNA, tanto em solução como incorporado na matriz do dsDNA, não apresentou qualquer evidência de que o ácido calvático pudesse causar algum dano à molécula de DNA, pois não apareceram os picos de oxidação das respectivas bases o que sugere que sua ação biológica não deve envolver o DNA como alvo. Observaram-se, no entanto, ondas de redução e oxidação referentes ao mecanismo redox do ácido calvático, mostrando que o ácido calvático penetra na matriz de DNA, sem causar dano

mensurável. O comportamento eletroquímico do ácido calvático incorporado diretamente no gel, no biossensor de *dsDNA* foi semelhante ao observado para a solução de ácido calvático, em contato com esse biossensor.

Os experimentos voltamétricos *in situ* com o biossensor de *dsDNA* mostraram o dano causado pelo **berenil** incorporado no gel de *dsDNA*. Isso foi possível devido ao aparecimento de picos diagnósticos da oxidação da guanina, o que indica interação e dano à molécula de DNA, a partir de concentrações de berenil da ordem de 10^{-5} mol L⁻¹.

No caso do berenil dissolvido em tampão acetato e posto em contato com o biossensor de *dsDNA*, o método se mostrou menos sensível do que o anterior (berenil incorporado no gel). Nesse caso, os picos diagnósticos somente aparecem em concentrações maiores de berenil, ca de 10^{-4} mol L⁻¹, sendo claramente visualizado na concentração de berenil de 10^{-3} mol L⁻¹. O dano causado pelo berenil ao DNA foi também dependente do tempo de exposição e um tempo mínimo de contato de 05 horas foi necessário.

Esse tipo de interação do DNA com berenil foi proposto anteriormente usando-se outros métodos, muito mais caros e sofisticados. O presente estudo sugere que o método eletroquímico pode ser usado como um complemento a esses métodos, com a vantagem de ser muito simples e facilmente realizados.

No caso da **mecloretamina**, foi possível detectar a interação desse agente alquilante com DNA através da observação de picos diagnósticos relacionados a oxidação das nucleobases, principalmente guanina, que apresenta um pico próximo a +0,800V vs. Ag/AgCl, Cl⁻ (0,1 mol L⁻¹). Pela análise da mecloretamina em solução pôde-se determinar que as medidas são dependentes da concentração e do tempo de exposição. Concentrações de mecloretamina tão baixas como 10^{-5} mol L⁻¹ podem causar danos ao *dsDNA* e sinais diagnósticos podem ser observados a partir de 3 horas, sendo melhor visualizados a partir de 6 horas de contato.

Os dois procedimentos utilizados com o biossensor de *dsDNA* levaram a resultados similares, exceto pela presença do pico de oxidação da adenina no caso da mecloretamina incorporada diretamente ao gel de *dsDNA*. Os resultados permitiram definir as melhores condições experimentais, as quais são a adição do analito diretamente no gel de *dsDNA*, em concentração $c > 10^{-5}$ mol L⁻¹ e deixado para secar por 24 horas.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M.A. *Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*. Coimbra, **1996**, cap. 1, p. 1-3.
- 2 <http://www.bath.ac.uk/~chsacf/solartron/electro/html/cv.htm>
- 3 WHITE, MARY ANNE. *Properties of materials*. Oxford, **1999**, cap.3, pág. 32-34.
- 4 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; Wiley; New York, **1990**.
- 5 DRYHURST, G. *Electrochemistry of Biological Molecules*, Academic Press, New York, **1977**, cap. 1, p. 1-5.
- 6 DE ABREU, F. C.; FERRAZ, P. A. L.; GOULART, M.O.F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, 13, 19.
- 7 KOVACIC, P., BECVAR, L. E. *Curr. Pharm. Des.* **2000**, 6, 143.
- 8 SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G. R.; *Free Radic Biol Med.* **2001**, 30, 1191.
- 9 FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J.; *Nature.* **2000**, 408, 239.
- 10 KOVACIC, P., OSUNA JR. J. A. *Curr. Pharm. Des.* **2000**, 6, 277.
- 11 RAJSKI, S. R., WILLIAMS, R. M. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2723.
- 12 SINHABABU, A. K., THAKKER, D. R. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1996**, 19, 241.
- 13 WARDMAN, P. *Curr. Med. Chem.* **2001**, 8, 739.
- 14 GANTCHEV, T.G.; HUNTING, D.J. *Mol. Pharmacol.* **1998**, 53, 422.
- 15 . HILLARD, E.; VESSIÈRES, A.; THOUIN, L.; JAOUEN, G.; AMATORE, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 285-290.
- 16 KATZUNG, B. C.; *Farmacologia Básica e Clínica*, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, **1994**, p. 579.
- 17 JAIN, R. K.; *Scientific Amer.* **1994**, 271, 42.
- 18 BROWN, J. M.; GIACCIA, A. J.; *Cancer Res.* **1998**, 58, 1408.
- 19 KENNEDY, K. A.; TEICHER, B. A.; ROCKWELL, S.; SARTORELLI, A.C.; *Biochem. Pharmacol.* **1980**, 29, 1.
- 20 LIVERTOUX, M-H, LAGRANGE, P., MINN, A. *Brain Res.* **1996**, 725, 207.
- 21 WARDMAN, P. J. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* **1989**, 18, 1637.
- 22 KELSON, B., MCNAMARA, J. P., PANDEY, A., RYAN, K. J., DORIE, M. J., MCAFEE, P. A., MENKE, D. R., BROWN, J.M., TRACY, M. *Anti-Canc. Drug Des.* **1998**, 13, 575.

- 23 IYANAGI, T., MAKINO, N., MASON, H. S. *Biochem.* **1974**, *13*, 1701.
- 24 ZUMAN, P.: “*Substituents Effects in Organic Polarography*” Plenum Press: New York, **1967**, caps. I, II and VIII, pp.1-21; 23-41; 273-308.
- 25 WARDMAN, P.: In “*Selective Activation of Drugs by Redox Processes*” Adams, G. E., Breccia, A., Fielden, E. M., Wardman, P., eds. Plenum Press: New York, **1990**, 11.
- 26 KUBOTA, T.; MIYAZAKI, H.; YAMAKAWA, M.; EZUMI, K.; YAMAMOTO, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1979**, *52*, 1588.
- 27 CAREY, F. A.; SUNDBERG, R. J.; *Advanced Organic Chemistry*, 4.ed., Plenum Press, New York, Parte A, **2000**, cap. 4, pp 204-215.
- 28 GUTIERREZ, P.L.; NGUYEN, B. In *Electrochemistry in Cancer: Applications to Pharmacological Studies of Quinone-containing Antitumour agents*. In *Redox Chemistry and Interfacial Behavior of Biological Molecules*; Dryhurst, G.; Niki, K., Ed.; Plenum Press; New York, **1988**, 369.
- 29 THORP, H.H. *Trends in Biotechnology*, **1998**, *16*, 117.
- 30 BRETT, A. M. O., MACEDO, T. R. A., RAIMUNDO, D., MARQUES, M. H., SERRANO, S. H. P. *Biosens. Bioelectronics*. **1998**, *13*, 861.
- 31 LA-SCALEA, M. A. et al.; *Química Nova*, *22*(3), 417, **1999**.
- 32 BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. N. ; *J. Braz. Chem. Soc.*; **1995**, *6*, 1, 97.
- 33 RAUF, S., GOODING, J.J., AKHTAR, K., GHAURI, M.A., RAHMAN, M., ANWAR, M.A., KHALID. A. M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 205.
- 34 BRETT, A. M. O., SERRANO, S. H. P., MACEDO, T., RAIMUNDO, D., MARQUES, M. H., LA-SCALEA, M. A. *Electroanal.* **1996**, *8*, 992.
- 35 BRETT, A. M. O., SERRANO, S. H. P., GUTZ, I. G. R., LA-SCALEA, M. A: *Electroanal.* **1997**, 110.
- 36 BRETT, A. M. O., SERRANO, S. H. P., GUTZ, I. G. R.; LA-SCALEA, M. A. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **1997**, *42*, 175.
- 37 BRETT, A. M. O., SERRANO, S. H. P., PIEDADE, J. A. P., COMPTON, R.G., HANCOCK, G.: In “*Comprehensive Chemical Kinetics*”, Elsevier: Amsterdam, **1999**, Vol. 37, 91-119.
- 38 DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, P., LOBO-CASTAÑÓN, M. J., MIRANDA-ORDIERES, A. J., MUÑÓN-BLANCO, P. *Electroanal.* **2004**, *16*, 1193-

- 1204.
- 39 WANG J., OZSOZ M., CAI X. H., RIVAS G., SHIRAISHI H., GRANT D. H., CHICHARRO M., FERNANDES J., PALECEK, E. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **1998**, 45, 33.
- 40 DE ABREU, F. C., GOULART, M. O. F., BRETT, A. M. O. *Electroanal.* **2002**, 14, 29.
- 41 BRETT, A. M. O., GOULART, M. O. F.; DE ABREU, F. C. *Bioelectrochem.*, **2002**, 56, 53.
- 42 NEDER, K., MARTON, L. J., LIU, L. F., FRYDMAN, B. *Cell Mol. Biol.* **1998**, 44, 465.
- 43 RYAN, M. D.; SCAMEHORN, R. G.; KOVACIC, P. *J. Pharmac. Sciences*, **1985**, 74, 492.
- 44 TRACY M, WARDMAN P. *Free Radical Research* **1996**, 25, 393.
- 45 CERECETTO, H.; DI MAIO, R.; GONZÁLEZ, M.; RISSO, M.; SAENZ, P.; SEOANE, G.; DENICOLA, A.; PELUFFO, G.; QUIJANO, C.; OLEA-AZAR, C. *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 1941.
- 46 DENNY WA, WILSON WR *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2000**, 9, 2889.
- 47 BAN, F.; GAULD, J. W.; BOYD, R.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 732-7325.
- 48 HWANG, J.; GREENBERG, M.M.; FUCHS, T.; GATES K. S. *Biochem.* **1999**, 38, 14248
- 49 BOSCHI, D.; CENA, C.; FRUTTERO, R.; BRENCIAGLIA, M. I.; SCALTRITO, M. M.; DUBINI, F.; GASCO, A. *Pharmazie* **2001**, 56, 670.
- 50 GASCO, A.; SERAFINO, A.; MORTARINI, V.; BIANCO, M. A.; SCURTI, J. C. *Tetrahedron Lett.* **1974**, 38, 3431.
- 51 UMEZAWA, H.; TAKEUCHI, T., IINUMA, H.; ITO, M.; ISHIZUKA, M.; KURAKATA, Y.; UMEDA, Y.; NAKANISHI, Y.; NAKAMURA, T.; OBAYASHI, A. & TANABE, O. *J. Antibiot. (Tóquio)* **1975**, 28, 87.
- 52 CALVINO, R.; FRUTTERO, R.; GASCO, A.; MIGLIETTA, A. & GABRIEL, L. *J. Antibiot. Tóquio* **1986**, 39, 864.
- 53 GADONI, E.; MIGLIETTA, A.; OLIVERO, A.; GABRIEL, L. *Biochem. Pharmacol.*, **1989**, 38, 1121.
- 54 GASCO, A. M.; DI STILO, A.; FRUTTERO, R.; GASCO, A.; BUDRIESI, R.; CHIARINI, A. *Med. Chem. Res.* **1993**, 28, 34.

- 55 CACCURI, A. M.; RICCI, G.; DESIDERI, A.; BUFFA, M.; FRUTTERO, R.; GASCO, A.; ASCENZI, PÁG. *Biochem. Mol. Biol. Enterre.*, **1994**, 32, 819.
- 56 ANTONINI, G.; PITARI, G.; CACCURI, A. M.; RICCI, G.; BOSCHI, D.; FRUTTERO, R.; GASCO, A.; ASCENZI, PÁG. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 245, 663.
- 57 CACCURI, A. M.; POLIZIO, F.; PIEMONTE, F.; TAGLIATESTA, PÁG.; FEDERICI, G & DESIDERI, A. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1122, 265.
- 58 BOSCHI, D.; CENA, C.; FRUTTERO, R.; GASCO, A. SORBA, G.; BERTINARIA, M.; DI STILLO, A.; GASCO, A.; SCALTRITO, M. M.; BRENCIAGLIA, M. I.; DUBINI, F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 403.
- 59 WOOD WW, SIMON WEJ, ACG CINZA, NAISBY, TW. *The American Chemical Society*, **1997**, 214: 144-AGRO, Part 1 SEP 7.
- 60 MORTARINI, V.; RUÀ, G.; GASCO, A.; BIANCO, A.A.; SANFILIPPO, A. *Eur. J. Med. Chem. – Chim. Therapeutica*, **1977**, 12 (1), 59.
- 61 NEWBOLD, in Patai, *The Chemistry of the Hydrazo, Azo and Azoxy Groups*, Wiley: New York, **1975**, part 2, pp 602-603, 614-624.
- 62 MOORE, D.S. & ROBINSON, S.D.; *Adv. Inorg. Chem. Radiochem*, **1986**, 30, 1-68.
- 63 GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; eds.; Mc Graw Hill: Rio de Janeiro, **1995**, p. 903-949.
- 64 WILLIAMSON, J. – *Exp. Parasitol.*, **1970**, 12, 274.
- 65 ABRAMOWICZ, M. – *Med. Lett. Drugs Ther.*, **1979**, 21, 105.
- 66 VIEIRA, L. M.; BARBOSA DE DEUS; NICOLATO, R. L. C. E ANDRADE, M. H. G. – *Rev. Bras. Anal. Clín.*, **1992**, 24, 43.
- 67 PEREGRINE, A. S.; MAMMAN, M. *Acta Tropica*, **1993**, Basel, v.54, p.185.
- 68 BARCELÓ, F.; ORTIZ-LOMBARDIA, M.; PORTUGAL, J.; *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, 1519, 175.
- 69 PORTUGAL, J.; WARING, M. J.; *Eur. J. Biochem.* **1987**, 167, 281.
- 70 GILMAN, A.; PHILLIPS, F. S. *Science* **1946**, 103, 409.
- 71 RAJSKI, S. R.; WILLIAMS, R. M.; *Chem Rev.* **1998**, 98, 2723.
- 72 BALCOME, S.; PARK, S.; DORR, D. R. Q.; HAFNER, L.; PHILLIPS, L.; TRETYAKOVA, N. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, 17, 950-962.
- 73 NIYAZYMBETOV, M. E.; EVANS, D. H. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 9627.

- 74 LUND, H. *In Organic Electrochemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc; N. York, **1991**, cap.6, p. 296.
- 75 DE PAULA, F. S.; CIOLETTI, A. G.; FRUTTERO, R.; DA SILVA F^o. J. F.; SANT'ANA, A. E. G.; DA SILVA, A. F.; GOULART, M. O. F., *J. Electroanal. Chem.*, **2003**, 544, 25.
- 76 O. EXNER in *Correlation Analysis in Chemistry*, N. B. Chapman and J. Shorter (eds.). Plenum Press, New York, **1978**, Chap. 10.
- 77 ISAACS, N. S.; *Physical Organic Chemistry*, 2nd edition, Longman Scientific & Technical, **1995**, pp 152-153.
- 78 SWAIN, C. G. and LUPTON, E. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, 90, 4328.
- 79 BROWN, H. C. and OKAMOTO, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, 80, 4979.
- 80 SIMONET, J.; GUEGUEN-SIMONET, N. in S. Patai (Ed.), *The chemistry of the hydrazo, azo and azoxy groups*, John Wiley & Sons, NY, **1997**. pp. 429-434.
- 81 ALSTON, J. Y.; FRY, A. J., *Electrochimica Acta*, **2004**, 455, 49.
- 82 KUBOTA, T.; MIYAZAKI, H.; YAMAKAWA, M.; EZUMI, K.; YAMAMOTO, Y.; *Chem. Pharm. Bull.*, **1983**, 31, 373.
- 83 HAZARD, R.; TALLEC, A. *Bull. Soc. Chim. France*, **1971**, 2917.
- 84 PERRETT, S.; WHITFIELD, P. J.. *Parasitol. Today*, **1996** 12, 156.
- 85 URBINA, J.A. *J. Mol. Med.* **1999** 77, 332.
- 86 ¹SCHIRMER, R. H.; MÜLLER, J. G.; KRAUT-SIEGEL, R. L.. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 141.
- 87 GOULART, M. O. F.; FREITAS, L. R.; TONHOLO, J.; DE ABREU, F. C.; RASLAN, D. S.; STARLING, S.; ZANI, C. L.; OLIVEIRA, A. B.; CHIARI, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2043.
- 88 MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. *Phytochemistry*, **1985**, 24, 639.
- 89 DOS SANTOS, A.F. *et al. Int. J. Parasitol.* **2000**, 30, 1199.
- 90 ANDREWS, P. *et al. Pharmacol. Ther.*, **1982**, 19, 245.
- 91 AVDEEF, A., BOX, K.J., COMER, J.E.A., GILGES, M., HADLEY, M., HIBBERT, C., PATTERSON, W., TAM, K.Y., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, 20, 631.
- 92 FRUTTERO, R.; CALVINO, R.; ARESKA, P.; BOSSA, R.; GALATULAS, I.; NINCI, M. *Anticancer Res.* **1989**, 9, 971-972.

- 93 CHUANG, L. FRIED, I.; ELVING, P. *J. Anal. Chem.* **1965**, 37, 1528.
- 94 ROIG, A.; PENA, M.P.; VICENTE, F.; STOCKERT, J.C. *J. Pharm. Sciences*, **1993**, 82, 251.
- 95 WEI, X.D., SPEISER, B., *Electrochim. Acta*, **1995**, 40, 2477-2482.
- 96 STECKHAN, E. In *Organic Electrochemistry*; Lund, H., Baizer, M., Eds., 3rd edition, Marcel Dekker: New York, **1991**; pp. 582.
- 97 NELSEN, S. F.; IPPOLITI, J. T. *J. Amer. Chem. Soc.* **1986**, 108, 4879.
- 98 BRETT, A. M. O.; GOULART, M.O.F.; DE ABREU, F.C. *Biosensors and Bioelectronics*, **2002**, 17, 913.
- 99 GEISSMAN, T.A. *Principles of Organic Chemistry*, 4.ed. **1977**, p. 168-173.